

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CENITA PEREIRA BORGES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CRÔNICO DOS INIBIDORES DA
PKC, TAMOXIFENO, *HYPERICUM PERFORATUM* E LÍTIO
EM RATOS *WISTAR* MACHOS E FÊMEAS**

**CRICIÚMA
2017**

CENITA PEREIRA BORGES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CRÔNICO DOS INIBIDORES DA
PKC, TAMOXIFENO, *HYPERICUM PERFORATUM* E LÍTIO
EM RATOS *WISTAR* MACHOS E FÊMEAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde para
a obtenção do título de doutora em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Luciano
Quevedo

Co-orientadora: Profa. Dra. Josiane
Budni

Co-orientadora: Profa. Dra. Samira
Valvassori

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B732a Borges, Cenita Pereira.

Avaliação do efeito crônico dos inibidores da PKC, tamoxifeno, *Hypericum perforatum* e lítio em ratos *wistar* machos e fêmeas / Cenita Pereira Borges. - 2017.

141 p. : il.; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: João Luciano Quevedo.

Coorientação: Josiane Budni, Samira Valvassori.

1. Proteína quinase C. 2. Tamoxifeno – Efeitos colaterais. 3. *Hypericum perforatum* – Efeitos colaterais. 4. Lítio – Efeitos colaterais. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Cenita Pereira Borges** sob o título “**AValiação do Efeito Crônico dos Inibidores da PKC, TAMOXIFENO, HIPERICUM PERFORATUM E LÍTIo EM RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 26 de maio de 2017.

Alexandra Loppi Zugno
Prof.ª Dra. ALEXANDRA LOPPI ZUGNO
Membro Relator – UNESC

Paulo Cesar Lock Silveira
Prof. Dr. PAULO CÉSAR LOCK SILVEIRA
Membro Interno – UNESC

Cristiane Damiani Tomasi
Prof.ª CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Membro Externo – UNESC

Karen Jansen
Prof.ª Dra. KAREN JANSEN
Membro Externo – UCPel

Josiane Budni
Prof.ª Dra. Josiane Budni
Rep. do Orientador Prof. João Luciano de Quevedo

Josiane Budni
Prof.ª Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

Aos meus amores Zélia, Fernando e
Lorenzo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem Ele eu não sou nada.

Ao meu orientador, professor Dr. João Luciano de Quevedo, pela oportunidade e confiança.

Ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa fornecida.

Ao Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde (PPGCS), em especial a secretária Diana Ghisi, pela atenção e competência.

À equipe de pesquisa, primeiramente aos alunos de iniciação científica que fizeram parte deste estudo, meu muito obrigada. Em especial ao Dimi que foi presença constante, sempre acessível e disposto. Aos colegas Roger Bittencourt Varela e Wilson Resende, vocês foram muito importantes nesta caminhada.

À Dra. Amanda Steckert, pela paciência, sabedoria, contribuição e amizade.

À professora Dra. Gislaine Réus Zilli e Dra. Camila Arent, pela amizade, sabedoria, conversas, incentivos e trocas. Vocês são especiais.

À minha co-orientadora, professora Dra. Josiane Budni, pela acolhida, paciência, incentivos e ensinamentos compartilhados.

À equipe de pesquisa de Neurodegeneração, pela acolhida, em especial à Franciele Mina e Ana Carolina Falchetti, pelas conversas, amizade e trocas.

À minha secretária, Francini Brigido, por organizar minha agenda nas minhas ausências e por toda dedicação.

Ao meu enteado, Alexandre Borges, que me ajudou no inglês, foi fundamental.

À toda minha família, pelas minhas ausências, pela paciência nos dias difíceis e por todo apoio. Sem vocês não teria conseguido.

E finalmente, a todos que tornaram este estudo possível, os meus mais sinceros agradecimentos.

*“Daquilo que sabes conhecer e medir,
é preciso que te despeças, pelo menos
por um tempo. Somente depois de
teres deixado a cidade, verás a que
altura suas torres se elevam acima das
casas. ”*

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

A Proteína quinase C (PKC) está intimamente envolvida em processos celulares de armazenamento de informações, formação de memória, plasticidade sináptica e sobrevivência e manutenção neuronal. Tendo em vista os efeitos inibidores da PKC de algumas substâncias usadas no tratamento de alguns transtornos psiquiátricos e outras patologias, neste estudo, foram avaliados os efeitos farmacológicos e a segurança da administração crônica de inibidores da PKC, tamoxifeno (TMX), *Hypericum perforatum* (HP) e lítio (Li), sobre alterações comportamentais, parâmetros de danos oxidativos e níveis de fatores neurotróficos no cérebro de ratos *Wistar*. Os animais receberam TMX (1mg / kg), HP (5mg / kg), Li (47,5 mg / kg) e água (grupo controle) durante um período de 28 dias, via gavagem. Os animais foram então submetidos aos testes comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado, reconhecimento de objetos e esquila inibitória. Além disso, os níveis de NGF, BDNF e GDNF foram avaliados no hipocampo e córtex frontal de ratos. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a formação de proteínas carboniladas foram avaliadas no córtex frontal, hipocampo, núcleo accumbens e estriado. Não foram observadas diferenças significativas nos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado e nado forçado, quando administrados os inibidores da PKC em ratos machos ou fêmeas. No teste de esquila inibitória, o tratamento com HP induziu dano na aquisição de memória em ratos machos e fêmeas. A administração de TMX ou HP, mas não de Li, diminuíram o índice de reconhecimento de objeto em ratos machos e fêmeas, no teste de reconhecimento de objetos. A administração crônica de HP e TMX diminuiu, e o Li aumentou, os níveis de BDNF no hipocampo de ratos machos e fêmeas. TMX e HP diminuíram os níveis de NGF somente no hipocampo de fêmeas. O TMX protegeu o dano lipídico no núcleo accumbens e estriado, enquanto HP diminuiu os níveis de TBARS no hipocampo, núcleo accumbens e estriado em ratos fêmeas. No córtex frontal, o tratamento com TMX e HP induziu o dano a proteína, enquanto que apenas o HP diminuiu os níveis de proteínas carboniladas no estriado. O TMX reduziu o dano lipídico no núcleo accumbens e estriado, enquanto HP diminuiu os níveis de TBARS no hipocampo, núcleo accumbens e estriado em ratos fêmeas. No córtex frontal, o tratamento com TMX e HP diminuiu o dano protéico, enquanto que apenas o HP diminuiu os níveis de proteínas carboniladas no estriado. Os resultados do presente estudo sugerem que o tratamento a longo

prazo com TMX ou HP pode conduzir a um déficit cognitivo significativo, pela diminuição dos níveis de fatores neurotróficos no cérebro de ratos machos e fêmeas quando comparado com o Li. Desta forma, sugere-se que a PKC está intimamente envolvida com a formação da memória. É importante ressaltar, que apesar do Li, TMX e HP, *per se*, mostrarem redução de dano oxidativo, o uso crônico de TMX e HP deve-se ter cautela quanto ao dano cognitivo.

Palavras-chave: Proteína quinase C, tamoxifeno, *hypericum perforatum*, lítio.

ABSTRACT

The Protein kinase C (PKC) is intimately involved in cellular processes information storage, memory formation, synaptic plasticity and neuronal survival and maintenance. In view of the PKC-inhibiting effects of some substances used in the treatment of some psychiatric disorders and other diseases, in this study, it was evaluated pharmacological effects and the safety of the chronic administration of Protein Kinase C (PKC) inhibitors, tamoxifen (TMX), *Hypericum perforatum* (HP) and lithium (Li), on behavioral changes, oxidative damage parameters neurotrophic factors levels in the brain of male and female *Wistar* rats. The animals received TMX (1mg/kg), HP (5mg/kg), Li (47,5 mg / kg) and water (control group), during 28 days, administered by gavage. The animals were then subjected to the behavioral tests: open-field, elevated plus-maze, forced swimming, novel object recognition, step-down inhibitory avoidance. In addition, the levels of NGF, BDNF and GDNF were evaluated in the hippocampus and frontal cortex of rats. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl formation were measured in the frontal cortex, hippocampus, nucleus accumbens and striatum. No significant differences were observed in the open-field, elevated plus-maze and forced swimming tests, when administered the PKC inhibitors in male or female rats. In the inhibitory avoidance test, the treatment with HP induced impairment on the acquisition of memory in male and female rats. The administration of TMX or HP, but not Li, decreased the recognition index of male and female rats in the object recognition test. The chronic administration of TMX and HP decreased and Li increased the BDNF levels in hippocampus of male and female rats. TMX and HP decreased the NGF levels in the hippocampus of female rats. The TMX reduced lipid damage in the nucleus accumbens and striatum, while HP decreased levels of TBARS in the hippocampus, nucleus accumbens and striatum in female rats. In the frontal cortex, treatment with TMX and HP decreased protein damage, whereas only hypericin decreased levels of carbonylated proteins in the striatum. The result of this presented suggest that the treatment the longer-term with TMX or HP can lead to a cognitive deficit significant, for the diminution of level of neurotrophic factors in the brain of male and female rats when compared to Li. Therefore, seems that the PKC is intimately involved with memory formation. It is important highlight, that despite Li, TMX and HP *per se*, show reduce oxidative damage, the use chronic TMX and HP should be cautious about the cognitive damage.

Keywords: Protein Kinase C, tamoxifen, *hypericum perforatum*, lithium.

LSTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura dos domínios da família da PKC. _____	42
Figura 2 - Ativação das isoformas da PKC convencional. _____	44
Figura 3 - Desenho experimental do protocolo geral do efeito da administração crônica por 28 dias com os inibidores da PKC. _____	68
Figura 4 - Ilustração esquemática do protocolo experimental 1. _____	71
Figura 5 - Teste do nado forçado.. _____	72
Figura 6 - Ilustração esquemática do protocolo experimental 2. _____	74
Figura 7 - Teste de reconhecimento de objeto. _____	76
Figura 8 - Esquema do protocolo experimental 3. _____	77
Figura 9 - Teste de campo aberto. Avaliação da atividade locomotora (cruzamentos) e exploratórias (levantamentos) em ratos machos (A) ou fêmeas (B) após administração crônica com lítio, tamoxifeno ou <i>hypericum perforatum</i> . Os dados representam a média \pm EPM. n = 10.81	
Figura 10 - Teste do labirinto em cruz elevado. Avaliação dos parâmetros de ansiedade. Registaram-se o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado. O teste comportamental foi realizado em ratos machos (A, B) e fêmeas (C, D), após administração crônica com lítio, tamoxifeno ou <i>hypericum perforatum</i> . Os dados representam a média \pm EPM. n= 10. _____	82
Figura 11 - Teste do nado forçado. Tempo de imobilidade registrado e tomado como medida de comportamento depressivo em ratos machos (A) e fêmeas (B), após administração crônica com lítio, tamoxifeno, ou <i>hypericum perforatum</i> . Os dados representam a média \pm EPM. n=10..	83
Figura 12 - Teste de reconhecimento de objetos (RO). Avaliação da memória de reconhecimento. Índice de reconhecimento dos objetos nas sessões de treinamento e teste para ratos machos (A) e fêmeas (B) que receberam os fármacos lítio, tamoxifeno ou <i>hypericum perforatum</i> . Os resultados são apresentados como médias \pm EPM do índice de reconhecimento. A sessão de teste foi realizada 24 horas após a sessão de treinamento. *p <0,001 diferente do teste de treinamento. #p <0,01 diferente do grupo controle, de acordo com ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste post hoc de Tukey. n = 10. MCD = Memória de curta duração/ MLD = Memória de Longa Duração. _____	84

Figura 13 - O teste de esquiwa inibitória foi utilizado para avaliação da memória aversiva. O tempo de latência foi registrado nas sessões de treinamento e teste para ratos machos (A) e fêmeas (B) que receberam lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum*. Os resultados são apresentados como medianas \pm intervalos interquartis (25 e 75). A sessão de teste foi realizada 24 horas após a sessão de treinamento. * $p < 0,001$ diferente do teste de treinamento. # $p < 0,01$ diferente do grupo controle, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney. $n = 10$. MI = Memória Imediata/ MCD = Memória de curta duração/ MLD = Memória de longa duração. _____ 86

Figura 14 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* nos níveis de proteína BDNF no hipocampo e córtex frontal de ratos machos (A) e fêmeas (B). Os dados representam a média \pm EPM * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. $n = 10$. _____ 87

Figura 15 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* níveis de NGF no hipocampo e córtex frontal em ratos machos (A) e fêmeas (B). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. $n = 10$. _____ 87

Figura 16 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* nos níveis de GDNF no hipocampo e córtex frontal de ratos machos (A) e fêmeas (B). Os dados representam a média \pm EPM. $n = 10$. _____ 88

Figura 17 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou administração de *hypericum perforatum* em níveis de TBARS de machos ($n = 3-7$) (A) e fêmeas ($n = 3-5$) (B). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de um via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. _____ 89

Figura 18 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* em relação ao conteúdo de grupamentos carbonil de machos ($n = 3-7$) (A) e fêmeas ($n = 3-5$) (B). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. _____ 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina ou serotonina (do inglês, *5-hydroxytryptamine*)
AKT – Proteína quinase B ou PKB (do inglês, *protein kinase B*)
AMPA – (receptor de) Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propionico (do inglês, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*)
AMPH – Anfetamina (do inglês, *Amphetamine*).
ANOVA – Análise de variância (do inglês, *Analysis of variance*)
BDNF – Fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)
BDZ – Benzodiazepínico (do inglês, *benzodiazepine*)
CAT – Catalase
CREB – Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc (do inglês *cAMP response element-binding protein*)
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CONCEA – Conselho nacional de controle de experimentação animal
DA – Doença de Alzheimer
DAG – Diacilglicerol (do inglês, *Diacylglycerol*)
d-AMPH – d-anfetamina (do inglês, *dextroamphetamine*)
DGK – DAG quinase (do inglês, *Diacylglycerol Kinase*)
DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
DP – Doença de Parkinson
EI – Esquiva inibitória
EPM – Erro padrão da média
RE – Retículo endoplasmático
ER – Receptor de estrogênio (do inglês, *estrogen receptor*)
ERK – Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*)
ERO_s – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)
ESJ – Erva de São João
GDNF – Fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia (do inglês, *glia cell line-derived neurotrophic factor*)
GPER1 – Receptor de estrogênio acoplado a proteína G (do inglês, *G Protein-coupled Estrogen Receptor 1*).
GPx – Glutatiana peroxidase (do inglês, *glutathione peroxidase*)

GSH – Glutathiona reduzida (do inglês, *reduced glutathione*)
GSK-3 – Glicogênio sintase quinase-3 (do inglês, *glycogen synthase kinase*)
HIV – Vírus da imunodeficiência humana adquirida (do inglês, *human immunodeficiency virus*)
HP – *Hypericum perforatum*
MI – Memória imediata
IMPase – Inositol monofosfatase
INPP1 – Polifosfatases
IP₃ – Inositol-1,4,5-trifosfato
IPPase – Inositol polifosfato-1-fosfatase
Li – Lítio
LTD – Depressão a longo prazo (do inglês, *long-term depression*)
LTP – Potenciação de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*)
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*)
MARCKS – substrato da quinase C rica em alanina miristolada (do inglês, *myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*)
MCD – Memória de curta duração
MDA – Malondialdeído
MLD – Memória de longa duração
NGF – Fator de crescimento do neural (do inglês, *nerve growth factor*)
NIMH – *U.S. National Institute of Mental Health*
NMDA – (receptor de) N-metil-D-aspartato (do inglês, *N-Methyl-D-Aspartate*);
NO – Óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)
NT – Neurotrofina
OUA – Oubaina
PI3K – Cinase – fosfatidil-inositol 3-cinase
PB1 – Pseudo-substrato e C1 atípica (do inglês, *pseudosubstrate and atypical C1*)
PIP₂ – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP₃ – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC – Proteína quinase C (do inglês, *protein kinase C*)
PKD – Proteína quinase D (do inglês, *protein kinase D*)
PLC – Fosfolipase C (do inglês, *phospholipase C*)
RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)
RO – Reconhecimento de objetos
SNC – Sistema nervoso central

SERMs – Moduladores seletivos do receptor do estrogênio (do inglês, *selective estrogen receptor modulators*)

SPSS – Pacote estatístico para as ciências sociais (do inglês, Statistical Package for the Social Scienc)

SOD – Superóxido dismutase (do inglês, *superoxide dismutase*)

TB – Transtorno bipolar

TBARS – Substância reativa derivada do Ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*)

TMX – Tamoxifeno

TrK – Receptor tirosina quinase (do inglês, *tyrosine kinase receptor*)

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

YMRS – Escala de avaliação de mania de *Young* (do inglês, *Young mania rating scale*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	41
1.1 PROTEÍNA QUINASE C (PKC)	41
1.2 PKC E TRANSTORNOS E DOENÇAS MENTAIS	45
1.3 INIBIDORES DA PKC	48
1.3.1 LÍTIO (Li)	48
1.3.2 TAMOXIFENO (TMX)	50
1.3.3 <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> (HP)	52
1.4 PKC E COGNIÇÃO	54
1.5 DANO OXIDATIVO E INIBIDORES DA PKC	56
1.6 FATORES NEUOTRÓFICOS BDNF, GDNF, NGF E TRANSTORNOS MENTAIS	58
1.7 DIFERENÇAS SEXUAIS NA REPOSTA FARMACOLÓGICA	62
1.8 JUSTIFICATIVA	63
2 OBJETIVOS	65
2.1 OBJETIVO GERAL	65
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
3 MATERIAIS E MÉTODOS	67
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	67
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	67
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	67
3.4 TAMANHO DA AMOSTRA	69
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	69
3.5.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (<i>OPEN FIELD</i>)	69
3.5.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (<i>ELEVATED PLUS-MAZE</i>)	70
3.5.3 TESTE DO NADO FORÇADO	72
3.5.4 TESTE DE MEMÓRIA AVERSIVA – ESQUIVA INIBITÓRIA	73
3.5.5 TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	74

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOQUÍMICAS.....	77
3.6.1 PREPARO DAS AMOSTRAS CEREBRAIS.....	77
3.6.2 MENSURAÇÃO DO DANO OXIDATIVO.....	78
3.6.2.1 Avaliação dos níveis substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	78
3.6.2.2 Avaliação do conteúdo de grupos carbonilas	78
3.6.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	79
3.6.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE BDNF, NGF E GDNF	79
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	80
 4 RESULTADOS	 81
 4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS	81
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOQUÍMICAS	86
 5 DISCUSSÃO.....	 92
 6 CONCLUSÃO	 103
 REFERÊNCIAS	 105
 ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	 140
 ANEXO B – ADENDO – PROTOCOLO: AD-007/2013	 142

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEÍNA QUINASE C (PKC)

A PKC, descoberta no final da década de setenta por Yasutomi Nishizuka (Inoue et al., 1977; Takai et al., 1977; Nishizuka, 2003), desempenha um papel fundamental em muitas funções biológicas, como apoptose, proliferação celular (Musashi et al., 2000), regulação da transcrição, respostas imunes, sinalização celular (Nishizuka, 1992) aprendizagem e memória (Nogues, 1997). Esta enzima pertence a uma superfamília de serina-treonina quinase (Azzi et al., 1992; Abrial et al., 2011), envolvida principalmente na fosforilação de proteínas alvo que controlam a ativação e a inibição de muitos processos celulares de forma direta ou indiretamente. Está também envolvida nos mecanismos de transdução do sinal da tirosina quinase e receptores acoplados à proteína G. Todas as PKCs consistem de domínios de regulação e catalítico N-terminal e C-terminal. A região catalítica é altamente homóloga entre diferentes isoformas. Entretanto, a região reguladora, que é responsável pelos requisitos de segundo mensageiro das isoenzimas, difere entre as PKCs (Toker, 1998; Ohno e Nishizuka, 2002; Abrial et al., 2011).

A família da PKC é subdividida em três subfamílias, de acordo com suas estruturas e características bioquímicas, reguladas de forma diferente e classificadas como: convencional ou clássica, “nova” ou atípica, de acordo com a natureza dos seus domínios de regulação (Griner e Kazanietz, 2007; Steinberg, 2008; Reyland, 2009; Newton, 2010; Rosse et al., 2010; Wu-Zhang e Newton, 2013) (Figura 1).

As isoenzimas convencionais (cPKC: α , β I, β II e γ) possuem cada um conjunto domínios C1A e C1B que se ligam ao diacilglicerol (DAG) ou ésteres de forbol em membranas e um domínio C2, que também se liga à membrana na presença do cálcio (Ca^{2+}). Isoenzimas novas (nPKC: δ , ϵ , θ e η) contém dois domínios em C1 que se ligam ao DAG ou ésteres de forbol, mas possuem um novo domínio C2, que não se liga de Ca^{2+} e não serve como um módulo de membrana-alvo; para compensar a falta de contribuição do domínio C2 no recrutamento da membrana, o domínio de novos C1B das isoenzimas tem 100 vezes mais elevada afinidade para o DAG em comparação com o domínio C1B das PKCs clássicas (Giorgione et al., 2006; Dries et al., 2007; Wu-Zhang e Newton, 2013). Isoenzimas atípicas (aPKC: ξ , ι e λ) não respondem ao DAG ou Ca^{2+} em vez disso, elas possuem um único domínio C1 atípica que retém a capacidade de se ligar

fosfolipídios aniônicos e um domínio PB1 (pseudo-substrato e C1 atípica) que medeia as interações proteína a proteína (Mochly-Rosen e Gordon, 1998; Newton, 2001; Tobias et al., 2016) (Figura 1).

Há também mais duas isoformas da PKC, μ e ι , que alguns autores consideram como uma quarta classe da proteína, e outros consideram como membros de outra família de proteínas quinases, a proteína quinase D (PKD) (Mochly-Rosen e Gordon, 1998; Newton, 2001).

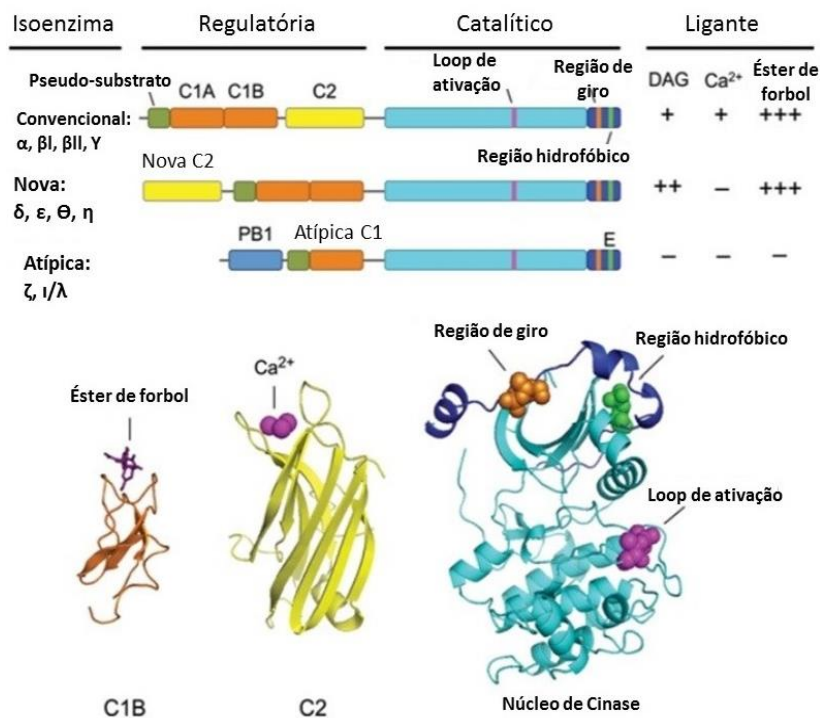


Figura 1 - Estrutura dos domínios da família da PKC. A figura mostra o segmento de pseudosubstrato auto inibitória (verde oliva), domínio C1 (laranja), domínio C2 (amarelo), núcleo quinase (azul piscina) e cauda C-terminal (azul escuro); loop de ativação (rosa), região de giro (laranja) e região hidrofóbica (verde). A figura mostra também os ligantes, que se ligam a cada subfamília, de acordo com as suas afinidades. Também são mostradas as estruturas cristalinas C1B, C2 e domínios cinases (Adaptado de Wu-Zhang e Newton, 2013).

A grande maioria das isoenzimas da PKC é altamente expressa em regiões do cérebro envolvidas na regulação do humor, hipocampo e córtex frontal, dentro dos neurônios e células gliais. Particularmente, a isoforma ϵ é predominantemente expressa no cérebro em comparação com os outros tecidos (Van der Zee e Douma, 1997; Petit et al., 2005; Goichberg et al., 2006). As isoformas diferem em sua estrutura, localização subcelular, especificidade do tecido, modo de ativação e especificidade do substrato (Machado-Vieira et al., 2011). Porém, o entendimento do papel das isoformas da PKC é limitado devido a alta homologia entre os subtipos da proteína e a falta de ativadores e inibidores que agem especificamente sobre cada isoenzima (Wilkinson e Hallam, 1994).

Até agora, nenhum dos moduladores da PKC identificados apresentam seletividade para uma isoenzima particular. Outra geração de moduladores mais seletivos da PKC, portanto, seria muito útil na definição do papel de cada isoforma da PKC (Abrial et al., 2011).

Dentre os sistemas de neurotransmissão modulados por essa proteína, está amplamente descrito na literatura a importância da PKC sobre a sinalização dopaminérgica, modulando os processos de internalização, transporte e reciclagem desse neurotransmissor (Melikian, 2004; Nissen-Meyer e Chaudhry, 2013). A PKC age, principalmente, inibindo a atividade e expressão dos receptores de dopamina, consequentemente, aumentando sua atividade na fenda sináptica (Robinson, 2002).

Os mecanismos que conduzem a ativação das isoformas da PKC convencionais tem sido extensivamente estudados e são esquematizados na Figura 2 (Abrial et al., 2011).

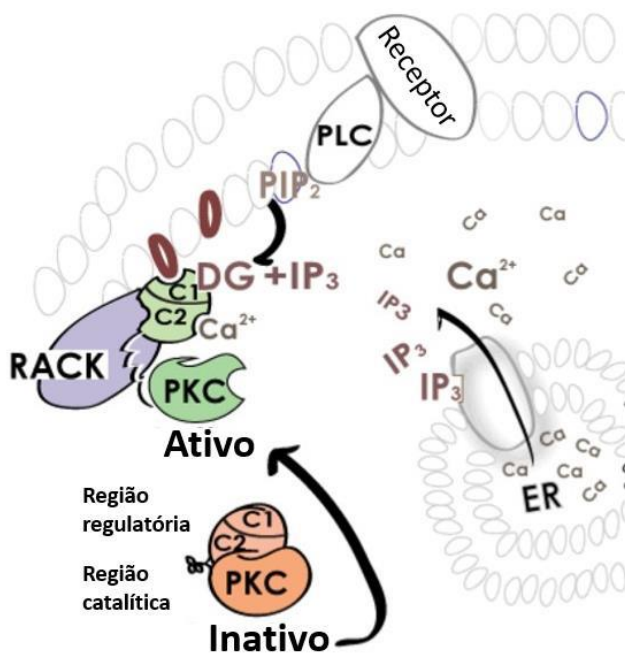


Figura 2 - Ativação das isoformas da PKC convencional. Primeiramente ocorre a interação de um ligante agonista do receptor acoplado a proteína G que ativa uma proteína Gq. A proteína Gq ativa a fosfolipase C (PLC), que por sua vez cliva o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) em DAG e inositol-1,4,5- trifosfato (IP₃). IP₃ interage com os canais de Ca²⁺ no retículo endoplasmático, para liberar Ca²⁺ das reservas intracelulares para o citoplasma. Aumento de Ca²⁺ intracelular em seguida, facilita a translocação da PKC para a membrana celular, onde é ativada pela DAG. A reciclagem de IP₃ é levada a cabo através do ciclo do fosfatidilinositol, em que duas enzimas, inositol polifosfato-1-fosfatase (IPPase) e inositol monofosfatase (IMPase), desempenham um papel fundamental. DAG é convertido em PIP₂ através de uma série de passos metabólicos que envolve a ação de uma enzima chamada DAG quinase (DGK). Retículo endoplasmático (RE) (Adaptado de Abrial et al., 2011).

Após a estimulação de receptores que aumentam Ca²⁺ intracelular e DAG, a PKC é recrutada para a membrana celular e é submetida às alterações conformacionais, que permitem a ligação do substrato e fosforilação (Abrial et al., 2011). Através de sua fosforilação, a PKC é capaz de modular uma multiplicidade de funções neuronais, como os processos de curto (liberação

de neurotransmissores), médio (regulação de receptores), e de longo prazo (a proliferação celular, a remodelação sináptica e expressão gênica) (Dai et al., 2009).

Assim, a PKC está em um cruzamento de vias de transdução de sinal de uma grande variedade de neurotransmissores e fatores de crescimento, que estão provavelmente implicados nos transtornos e doenças mentais.

1.2 PKC E TRANSTORNOS E DOENÇAS MENTAIS

Grande parte do interesse na PKC começou com a descoberta de que os membros desta família de isoenzimas são ativados em muitas doenças e transtornos mentais como evidenciado nos estudos em tecidos humanos e modelos animais (Mochly-Rosen et al., 2012). Neste contexto, a PKC é amplamente reconhecida como alvo terapêutico para o câncer, a erradicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV), diabetes, cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA), psoríase, acidente vascular cerebral, complicações de pulmão e rim, algumas doenças autoimunes, transtornos depressivos e transtorno bipolar (TB) (Irie et al., 2005; Battaini e Mochly-Rosen, 2007; DeChristopher et al., 2012; Irie et al., 2012; Das e Rahman, 2014; Loy et al., 2015).

Entretanto, nos últimos anos, pesquisas tem investigado cada vez mais o papel das cascatas de sinalização intracelular na fisiopatologia e no tratamento do TB (Manji e Lenox, 2000; Bezchlibnyk e Young, 2002; Coyle e Duman, 2003; Einat et al., 2007) e a via da PKC é uma das cascatas de sinalização que tem recebido um interesse considerável no TB, pois os estudos clínicos e pré-clínicos mostram que o tratamento farmacológico restabelece a atividade da PKC e melhora os sintomas clínicos (Manji e Lenox, 1999; Einat e Manji, 2006; Zarate e Manji, 2009; Andreazza et al., 2010; Yildiz et al., 2011). Os mecanismos intracelulares e intercelulares relacionados a fisiopatologia do TB incluem alterações em sistemas de neurotransmissão, segundos mensageiros, vias que envolvem a transdução de sinal e regulação da expressão gênica (Machado-Vieira et al., 2010).

Estudos conduzidos em tecidos *post-mortem* indicaram que indivíduos portadores do TB possuem alterações na atividade das proteínas G no córtex frontal, temporal e parietal (Young et al., 1991; Mathews et al.,

1997). A importância destes achados iniciais se dá pelo fato de que a ativação das proteínas G desencadeiam uma cascata de transmissão da informação (sinalização) intracelular, por meio de segundos mensageiros, proteínas quinases, como a PKC, e outros efetores (Gould e Manji, 2002; Kapczinski et al., 2004). Sabe-se que a via do PIP_2 ativa a PKC que estimula a liberação de Ca^{2+} no RE (Gould et al., 2004; Hoertel et al., 2013).

Muitas evidências suportam o papel da via de sinalização da PKC no TB (Mochly-Rosen et al., 2012), as quais incluem: 1) sintomas tipo-mania induzidos por anfetamina em roedores são correlacionados com a ativação da PKC no cérebro (Einat, 2007). É conhecido que os psicoestimulantes são capazes de desencadear episódios maníacos em indivíduos suscetíveis e induzir comportamentos maníacos e a hiperatividade em roedores, assim as drogas psicoestimulantes são conhecidas por ativar PKC (Einat, 2007; Boudanova et al., 2008; Moretti et al., 2011); 2) tanto o lítio (Li) como o valproato, dois fármacos eficazes no tratamento do TB, diminuem indiretamente a atividade de ambos $\text{PKC}\alpha$ e $\text{PKC}\epsilon$, *in vitro* e *in vivo* (Manji e Lenox, 1999; Hahn et al., 2005; Zarate et al., 2007; Chen et al., 2009); 3) estudos *pós-mortem* revelam um aumento significativo da atividade da PKC no córtex frontal de pacientes com TB (Wang e Friedman, 1996; Yildiz et al., 2016). Esse achado também foi demonstrado em estudos com plaquetas (Friedman et al., 1993; Wang et al., 1999). A inibição farmacológica da PKC resulta em muitas alterações comportamentais semelhantes as induzidas pelos estabilizadores do humor. Estes incluem uma atenuação da hiperatividade, comportamentos de risco e também condução hedônica (Soares et al., 2000).

Neste sentido, é importante compreender que o tratamento do TB se concentra convencionalmente na estabilização aguda, em que o objetivo é trazer um paciente com mania ou d

epressão a uma recuperação sintomática com humor eutímico (estável), e na manutenção, em que os objetivos são a prevenção da recaída, redução dos sintomas subliminares e melhora do funcionamento social e ocupacional. O tratamento de ambas as fases do transtorno pode ser complexo, porque os mesmos tratamentos que aliviam a depressão podem causar mania, hipomania, ou ciclagem rápida (definida como quatro ou mais episódios em 12 meses), e os tratamentos que reduzem a mania podem causar episódios depressivos rebote (Kessing e Andersen, 1999; Price e Marzani-Nissen, 2012).

Também têm sido encontradas alterações da via de sinalização da PKC

em vários modelos animais de depressão (Powell et al., 1994; Hrabetova e Sacktor, 1996; Hernandez et al., 2003; Oster et al., 2004; Cunha et al., 2014), a administração crônica de antidepressivos diminuiu a atividade da PKC no córtex frontal e hipocampo de ratos e, geralmente, após o estresse (Mann et al., 1995). No estudo de Palumbo et al. (2009) foi mostrado que camundongos C57BL/6, expostos ao estresse crônico leve, apresentam diminuição da atividade da PKC no hipocampo. Da mesma forma, foi demonstrado que a atividade da PKC foi significativamente diminuída no córtex frontal e no hipocampo de adolescentes vítimas de suicídio (Pandey et al., 2004; Pandey et al., 2008), com diagnóstico de depressão. No entanto, nos estudos que mostram o papel da PKC com pacientes com depressão apresentam resultados bastante divergentes. Shelton et al. (2009), mostraram que em cérebro *post mortem* de indivíduos que apresentavam depressão, a PKC não estava alterada, enquanto outro estudo do mesmo grupo (Shelton et al., 2009) mostrou que em cérebro *post mortem* de pacientes depressivos houve uma redução na atividade da PKC. Além disso, a fosforilação da PKC na GluN1S896, o qual faz parte do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), foi aumentada no córtex frontal de animais tratados com imipramina (Szabo et al., 2009), sugerindo que a PKC tem um importante papel na regulação das funções do receptor NMDA.

Importante ressaltar que, as alterações no sistema glutamatérgico têm sido associadas a depressão. Um estudo de revisão publicado por Sanacora et al. (2008) mostrou que o receptor NMDA está alterado no córtex frontal, temporal superior, cíngulo posterior, pré-frontal dorsolateral e no hipocampo, e o receptor Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), também um receptor glutamatérgico, está alterado no córtex frontal dorsolateral, tálamo, estriado e no hipocampo em indivíduos com depressão (Réus, 2011).

Até agora, apesar de terem sido alcançadas melhorias significativas no perfil de segurança da farmacoterapia para diversas doenças e transtornos mentais, ainda há uma série de dimensões críticas para as quais são necessárias melhorias na eficácia dos fármacos (Zarate et al., 2006). A inibição da PKC foi recentemente sugerida como uma nova abordagem para o desenvolvimento de fármacos, principalmente os estabilizadores do humor. Existem muitos inibidores da PKC, entre eles encontra-se o valproato, Li, Tamoxifeno (TMX) e *Hypericum Perforatum* (HP). Dentre eles, Li, TMX e HP serão foco do presente estudo.

1.2 INIBIDORES DA PKC

1.3.1 Lítio (Li)

O Li foi introduzido e testado por Cade (1949) para o tratamento do TB, em seguida foi testado para a DP e DA. Desde então, passaram-se 68 anos, e permanece até hoje como o fármaco mais eficaz e é considerado padrão ouro para o tratamento do TB (Geddes et al., 2010; Rybakowski, 2011; Yatham et al., 2013). A eficácia na estabilização do humor a longo prazo foi apoiada por uma gama de evidências empíricas e experiências clínicas (Quiroz et al., 2010; Malhi et al., 2013). Este fármaco apresenta diversos efeitos terapêuticos nos episódios agudos de mania e depressão, prevenção de novos episódios, potencializador da depressão unipolar refratária, redução do risco de suicídio e comportamentos suicidas, propriedades neuroprotetoras e neurotróficas (Machado-Vieira et al., 2009; Jope, 2011), as quais melhoram os prejuízos associados à plasticidade e resiliência celular, as quais estão prejudicadas no TB (Zarate et al., 2006; Bachmann et al., 2009; Schloesser et al., 2012). No entanto, o mecanismo de ação é complexo, influenciando múltiplas vias de sinalização (Machado-Vieira et al., 2009; 2014).

Estudos ressaltam, que a PKC é um dos principais alvos bioquímicos do Li, e têm sugerido que a ação de estabilizadores do humor, pode ser o ponto de partida para os seus efeitos antimaníacos. O Li atenua a função da PKC na modulação da mania, enquanto outros fármacos pró-maníacos ativam essa proteína, sugerindo que a modulação da PKC tem papel central no tratamento de episódios maníacos (Machado-Vieira et al., 2009; Jope, 2011). O tratamento repetido com anfetamina (AMPH) não só aumentou a atividade locomotora, como também aumentou comportamentos de risco em ratos. Além disso, o tratamento com Li inibiu o comportamento de risco (Valvassori et al., 2010; Moretti et al., 2011; Cechinel-Recco et al., 2012; Steckert et al., 2013; Zhou et al., 2015). Os efeitos do Li na atividade da PKC parecem ser bifásicos, uma vez que o tratamento agudo facilita eventos intracelulares mediados pela PKC, enquanto tratamento a longo prazo diminui sua atividade (Manji et al., 1993).

O Li, pode agir também potencializando o efeito de antidepressivos, pois causa aumento da liberação de serotonina (5-HT) tanto basal quanto induzida por estímulos (Jope, 1999; Manji e Lenox, 1999; Lenox e Hahn, 2000; Brunello e Tascedda, 2003; Brunello, 2004). A administração

crônica do Li pode resultar em atividade reduzida das isoformas da PKC α e ϵ no córtex frontal e hipocampo (Manji et al., 1993; Li e Jope, 1995; Manji et al., 1996; Zarate e Manji, 2009). A isoenzima alvo tem grande importância, pois pode levar a efeitos terapêuticos mais específicos e possivelmente minimizar a ocorrência de eventos adversos desnecessários (DiazGranados e Zarate, 2008).

Diversos estudos consideram como relevante para eficácia terapêutica do Li, a inibição do inositol-monofosfatase 1 e 2 (IMPA1 e IMPA2) e a interferência na via do fosfatidilinositol, levando a redução das concentrações cerebrais de inositol (Wang et al., 1999; Williams et al., 2002; Hahn et al., 2005). A inibição das IMPA1 e IMPA2 e Polifosfatases (INPP1), leva à depleção de mio-inositol, o que leva a uma cascata de eventos, induzindo ativação da PKC, que culminaria na ativação de fatores indutores ou supressores da transcrição gênica (Manji e Lenox, 1999). O ciclo do fosfatidilinositol é responsável pelas vias de transmissão adrenérgicas, serotoninérgicas e colinérgicas. Faz-se importante ressaltar que a ação específica é fundamental quando há um estímulo excessivo de neurotransmissores nos receptores celulares do córtex cerebral, hipocampo e núcleo estriado (Casebolt e Jope, 1989), além do hipotálamo e núcleo caudado (Allison e Blisner, 1976). Inibir o ciclo do fosfatidilinositol nessas regiões de hiperatividade dos receptores resulta, portanto, em melhor modulação das vias de transmissão, o que significa maior equilíbrio dos efeitos dos neurotransmissores envolvidos (Wang e Friedman, 1996; Quiroz et al., 2010).

Outro mecanismo de ação do Li trata-se de um importante substrato para a atividade da PKC, a proteína substrato da quinase C rica em alanina miristolada (MARCKS) que é uma proteína-chave que tem a função de regular a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica e coordenar a distribuição de microtúbulos no interior das células influenciando a neuroplasticidade (Sela, 2004; Hahn et al., 2005). A redução da concentração intracelular da MARCKS ocorre na presença de Li, por meio da ativação da PKC. De acordo com diversos estudos, a administração crônica do Li também diminuiu a fosforilação de vários substratos da PKC, tais como MARCKS, citado anteriormente, neurogranina, NMDA e receptores AMPA no hipocampo e córtex de roedor (Lenox et al., 1992; Jensen e Mork, 1997; Szabo et al., 2009; Quiroz et al., 2010). Todos estes dados sugerem que a PKC pode estar envolvida no efeito terapêutico do Li (Quiroz et al., 2010).

No estudo de Hashimoto et al. (2002), o Li aumentou os níveis de fator

neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) após 5 dias de tratamento em roedores, o que é muito semelhante ao tempo que o Li leva para ter um efeito em pacientes (6-10 dias), implicando fortemente o BDNF nos efeitos neuroprotetores do Li. A neuroproteção (que envolve diretamente efeitos neurotróficos) é uma estratégia terapêutica destinada a retardar ou interromper a progressão da perda neuronal, produzindo assim benefícios a longo prazo, influenciando favoravelmente o resultado e impedindo o aparecimento dos transtornos ou o declínio clínico (Machado-Vieira et al., 2009; Zhou et al., 2014; Emamghoreishi et al., 2015; Manosso et al., 2015). Outra ação neuroprotetora do Li, é através da inibição da enzima glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3), que é responsável pela regulação de processos neuronais, incluindo a apoptose e a remodelagem do citoesqueleto. A inibição da GSK-3 pode contribuir para a proliferação e os efeitos anti-apoptóticos do Li, que aumentam substancialmente a expressão da Bcl-2, uma importante proteína reguladora e citoprotetora conhecida como proteína 2 dos linfócitos ou células B no sistema nervoso central (SNC), tanto em córtex de rato quanto em células humanas de origem neuronal (Luca et al., 2016).

Embora o Li seja o padrão-ouro no tratamento do TB, um grande número de pacientes não respondem adequadamente ou não toleram o tratamento, devido aos elevados efeitos colaterais, como tremor das mãos, polidipsia, poliúria e uma diminuição da função da tireoide. Em doses elevadas, o Li produz insuficiência renal, convulsões e pode também causar coma (Schou, 1976; Greil, 1981; Oruch et al., 2014). Desta forma ocorre um grande número de remissões do tratamento, tornando necessário associar Li com outras fármacos na esperança de reduzir os efeitos colaterais dos pacientes e aumentar o potencial terapêutico deste fármaco (Hogan e Freeman, 2016).

1.3.2 Tamoxifeno (TMX)

O TMX é um fármaco sintético pertencente a classe das substâncias moduladoras seletivas de receptores de estrogênio (*Selective Estrogen Receptors Modulators* - *SERMs*), ou seja, pode funcionar como agonista em alguns tecidos, como por exemplo, o tecido mamário, e antagonista em outros, como os tecidos cardíaco, endometrial e ósseo (Riggins et al., 2007). Classificado como o principal hormônio sexual feminino, o estrogênio está envolvido no crescimento dos órgãos sexuais femininos, na distribuição da gordura corporal e na regulação de vários comportamentos. No SNC, o estrogênio melhora a cognição e a memória, ao mesmo tempo que oferece

proteção contra vários insultos neurotóxicos (Engler-Chiurazzi et al., 2016).

O TMX é amplamente usado no tratamento de câncer de mama em estágios iniciais e na prevenção da recorrência de tumores malignos nos tecidos mamários. Além disso, é um potente inibidor da atividade da PKC em concentrações elevadas (Horgan et al., 1986; O'Brian et al., 1988; Gould e Manji, 2002) agindo diretamente sobre a PKC α , PKC β I, PKC η , PKC δ e PKC ζ . Entretanto, estudos mostram que as contribuições dos efeitos antiestrogênicos para as propriedades antimaníacas de TMX parecem ser mínimas em comparação com a inibição da PKC (Armani et al., 2014). Pode ser administrado perifericamente e é o único inibidor da PKC aprovado para uso em humanos (Baltuch et al., 1993; Zarate e Manji, 2009). Contudo, sua utilidade clínica precisa ser mais explorada, pois pode ter importantes efeitos se usado a longo prazo. O TMX é geralmente tomado por cinco anos, seguido por uma terapêutica diferente, dependendo da condição do paciente. Resultados recentes do estudo adjuvante sobre o TMX *Longer Against Shorter* (ATLAS), concluíram que dez anos de tratamento adjuvante com TMX reduzem a mortalidade em mais de cinco anos (Davies et al., 2013). Como tal, é importante considerar os efeitos a longo prazo do TMX sobre as funções do SNC. Porém, o uso prolongado de TMX no tratamento de transtornos de humor é controverso. A PKC desempenha um papel importante na regulação da plasticidade sináptica, da potencialização de longa duração (LTP) e da depressão a longo prazo (LTD), regulando assim o humor, o aprendizado e a memória (Liu et al., 2014). Além disso, deve ser ressaltado, como citado anteriormente que, a sinalização de estrogênio tem um papel importante nas regiões cerebrais envolvidas na regulação emocional e cognitiva (Brinton et al., 2008; Wharton et al., 2012). Uma vez que os pacientes com TB necessitam de um tratamento farmacológico contínuo ao longo de toda a sua vida, os possíveis efeitos de bloqueio da PKC e de inibição de estrogênio proporcionados pelo TMX podem levar a efeitos colaterais negativos em alguns pacientes (Zarate e Manji, 2009; Armani et al., 2014).

No entanto, vários estudos pré-clínicos têm apoiado o potencial do TMX no tratamento de episódios agudos de TB (Zarate et al., 2007; Yildiz et al., 2008; Armani et al., 2014). Ensaio clínico preliminares relataram os efeitos antimaníacos deste fármaco (Bebchuk et al., 2000; Kulkarni et al., 2006). É importante notar que todas as observações clínicas relacionadas aos efeitos antimaníacos do TMX estão no tratamento de episódios agudos (3 à 6 semanas de tratamento) e nenhum estudo ainda avaliou os efeitos

deste fármaco a longo prazo (Bebchuk et al., 2000; Kulkarni et al., 2006; Yildiz et al., 2008; Amrollahi et al., 2011; Yildiz et al., 2016).

A administração do TMX, preveniu e reverteu a hiperatividade e o comportamento de risco, além de proteger o cérebro contra o aumento dos níveis da PKC, em ratos submetidos a um modelo de mania induzido por d-anfetamina (d-AMPH) e reduziu sintomas maníacos em pacientes bipolares, sugerindo sua eficácia no tratamento da mania (Einat, 2007; Zarate et al., 2007; Yildiz et al., 2008; Zarate e Manji, 2009; Cechinel-Recco et al., 2012). No estudo de Cechinel-Recco et al. (2012), ocorreu um aumento dos níveis do fator de crescimento neural (NGF) e BDNF após a administração de TMX, mostrando uma proteção ao cérebro dos animais contra a diminuição desses fatores, causados pelo tratamento com d-AMPH, além de favorecer a plasticidade neuronal.

Em um estudo duplo-cego realizado pelo Instituto de Saúde Mental Americano (*U.S. National Institute of Mental Health – NIMH*) foi verificado que os pacientes bipolares que receberam TMX apresentaram uma diminuição nos sintomas maníacos em relação ao grupo que recebeu placebo (Zarate et al., 2007). Corroborando estes achados, Bebbchuk et al. (2000) observaram que os pacientes que receberam TMX apresentaram uma melhora significativa dos sintomas maníacos, demonstrada pela redução na pontuação da escala de mania de Young (*Young Mania Rating Scale – YMRS*), em comparação ao grupo controle. Estes estudos reforçam a hipótese de envolvimento da PKC na fisiopatologia e tratamento do TB.

Um dos pontos fortes do TMX é que, em comparação ao Li, provoca relativamente poucos efeitos colaterais. Portanto, o TMX é bastante tolerado, mesmo em doses altas (até 200 mg/dia), e os seus efeitos secundários são náuseas, ondas de calor e cansaço (Tang et al., 2006).

Até o momento, não há estudos evidenciando o efeito do tratamento crônico deste fármaco na memória, ansiedade e depressão em animais, portanto o presente estudo irá avaliar o efeito crônico do TMX *per se*.

1.3.3 *Hypericum Perforatum* (HP)

HP, popularmente chamada de erva de São João (ESJ), é uma planta herbácea tradicionalmente conhecida por suas propriedades medicinais incluindo a cicatrização de feridas, efeitos diurético, antibióticos e antivirais (Kitanov, 2001). É uma das plantas medicinais mais estudadas em todo o mundo e contém um variedade de constituintes químicos com propriedades farmacológicas confirmadas, como os flavonóides, ácidos

fenólicos, taninos, hipericinas (iso, proto e pseudo hipericinas) e hiperforinas que são farmacologicamente ativos (Curtis e Lersten, 1990; Briskin et al., 2000; Perloff et al., 2001; Hennessy et al., 2002; Schwob et al., 2002; Jackson et al., 2014). O extrato da ESJ (HP, hiperforina pura e hipericina) mostrou consistentes propriedades antidepressivas em modelos comportamentais em roedores e humanos (Butterweck et al., 1997; Ozturk, 1997; Chatterjee et al., 1998; Gambarana et al., 1999; Gobbi et al., 1999; Panocka et al., 2000; Gobbi e Mennini, 2001; Mennini e Gobbi, 2004; Galeotti et al., 2014)

Em estudos realizados por Behnke et al. (2002), a atividade do extrato de HP foi comparada a fluoxetina em pacientes com depressão. Não ocorreu diferença significativa na resposta aos tratamentos. Em um estudo semelhante desenvolvido por van Gorp et al. (2002), o extrato do HP nas doses de 900 a 1.800 mg/dia foi comparado a sertralina nas doses de 50 a 100 mg/dia, em pacientes com depressão. Neste estudo também não foram observadas diferenças estatísticas nas taxas de resposta terapêutica. Porém em ambos os estudos as respostas terapêuticas foram equivalentes aos fármacos fluoxetina e sertralina e é, portanto, uma alternativa aos antidepressivos sintéticos, sendo que foi melhor tolerada pelos pacientes. Outros estudos corroboram esse achado, uma vez que os extratos hidroalcoólicos de HP parecem ter efeitos colaterais menores que os antidepressivos convencionais no tratamento da depressão leve a moderada (Francis, 2005; Kasper et al., 2010; Chen et al., 2011) e pode ser uma alternativa para clínica.

Alguns estudos demonstram que os mecanismos antidepressivos do HP ocorrem através da inibição da recaptação da serotonina (Apaydin et al., 2016). O HP também tem um efeito sobre vários sistemas de neurotransmissores através da regulação dos níveis de serotonina, noradrenalina e dopamina no cérebro (Calapai et al., 2001; Bano et al., 2014). Além disso, esta erva medicinal provoca a redução da atividade dos receptores D₂ e aumento da atividade dos receptores 5-HT_{2A} e dos receptores para benzodiazepínicos (BDZ), GABAérgicos (Muller et al., 1997). O HP também pode atuar aumentando os níveis de Ca²⁺ intracelular em neurônios pré-sinápticos vagais aferentes, o que por sua vez leva a uma liberação maior de neurotransmissores (Vance et al., 2014). Estudos também relataram que o HP pode atuar como um inibidor da PKC (Takahashi et al., 1989; Di Carlo et al., 2001; Kubin et al., 2005; Galeotti et al., 2014), competitivamente ligando ao domínio de regulação da PKC (Kocanova et al., 2006). Há uma quantidade considerável de dados na

literatura que demonstram que o HP exerce efeitos neuroprotetores no cérebro de maneiras distintas (Kraus et al., 2010; Gomez del Rio et al., 2013)

O HP reduz a formação de óxido nítrico (NO), um mediador pró-inflamatório, ao diminuir a expressão do RNAm da NO sintase induzível (Kraus et al., 2010). Adicionalmente, os efeitos neuroprotetores de HP foram avaliados num modelo animal de DP induzida por rotenona. O HP foi capaz de reduzir os danos neuronais e a morte celular dopaminérgica e causou a inibição da cascata apoptótica ao diminuir os níveis de Bax no cérebro, uma proteína pró-apoptótica (Gomez del Rio et al., 2013). Além disso, alguns estudos demonstraram os efeitos do HP contra o dano cognitivo em vários modelos diferentes de estresse crônico e DA (Trofimiuk et al., 2005; Trofimiuk et al., 2006; Trofimiuk e Braszko, 2008; Trofimiuk et al., 2010; Trofimiuk et al., 2011; Hofrichter et al., 2013). Em estudo desenvolvido por Crupi et al. (2011) a administração crônica de HP reverteu o efeito ansiogênico induzido pela corticosterona em animais. Portanto, pode-se sugerir que a administração de HP reverte os efeitos negativos do estresse que afetam a maturação de neurônios do hipocampo.

Estudos realizados por Zou et al. (2004) demonstraram que testes *in vitro* com o extrato de HP revelaram também forte atividade antioxidante. O extrato atuou como um agente doador de hidrogênio e redutor do ferro (III) a ferro (II). Além disso, o extrato agiu efetivamente como sequestrador dos radicais ânions superóxido e inibidor da degradação da desoxirribose.

Hunt et al. (2001) observaram a atividade antioxidante do extrato de HP (5mg/kg) contra o ânion superóxido por meio do efeito de neutralização dos radicais livres. Em outro estudo, Mohanasundari et al. (2006) concluíram que o extrato de HP na dose de 300 mg/Kg administrado em animais melhora a eficácia da atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx).

De acordo com uma vasta revisão da literatura, não há estudos demonstrando o efeito do tratamento crônico do HP na memória, ansiedade e depressão em animais, portanto o presente estudo tem como um dos objetivos avaliar o efeito crônico da HP *per se*.

1.4 PKC E COGNIÇÃO

A PKC é uma das quinases que controlam a cognição e desempenha um papel essencial na aquisição e manutenção da memória. Está envolvida em processos celulares de armazenamento de informações (Nishizuka, 2003) e

processos importantes para a formação e consolidação da memória (Atkins et al., 1998; Wallenstein et al., 2002; Ahi et al., 2004; Nelson et al., 2008). Tem uma função bem estabelecida nos processos de memória em modelos animais (Burchuladze et al., 1990; Zhao et al., 1994; Nogues, 1997; Sun et al., 2009; Mochly-Rosen et al., 2012). Estudos mostram que a atividade hipocampal da PKC aumenta imediatamente depois do treino na tarefa de esquiiva inibitória, alcança um pico 30 minutos mais tarde e retorna aos níveis normais durante os próximos 120 minutos depois do treino (Bernabeu et al., 1995; Cammarota et al., 1997). Além disso, o aprendizado em uma tarefa para avaliar a memória espacial aumenta os níveis da PKC ligados a membrana (forma ativa), no hipocampo de ratos (Nogues et al., 1994; Golski et al., 1995), e a atividade da enzima está reduzida em camundongos com baixo aprendizado (Wehner et al., 1990).

A PKC também tem mostrado que desempenha um papel importante na via de transdução de sinal, alterada na DA. A alteração da atividade da PKC estimula a produção de peptídeos beta-amilóide e a hiperfosforilação da proteína tau (de Barry et al., 2010). A ativação da PKC promove a sinaptogênese no hipocampo (Hongpaisan e Alkon, 2007; Sun e Alkon, 2010). Assim, a ativação de isoenzimas da PKC a níveis apropriados resulta na melhora da memória em geral. Porém, a hiperativação da PKC pode, no entanto, prejudicar a aprendizagem e a memória, como a memória de trabalho em jovens e idosos (Brennan et al., 2009), podendo levar a neurodegeneração (Alfonso et al., 2016). PKC está sendo considerada como um potencial biomarcador para a DA (de Barry et al., 2010).

No estudo de Sacktor (2012), foi verificado que a hiperatividade da PKC aumentou o transporte pós-sináptico e a inibição da PKC inibiu a LTP, sugerindo que a sinalização da PKC pode modular a atividade a longo prazo em neurônios e sinapses (Sacktor, 2012; Zhang et al., 2016). Um estudo de Yang et al. (2004) demonstrou que ocorria tanto a inibição da indução, quanto a reversão da manutenção da LTP em espinha dorsal de ratos, quando os mesmos utilizavam inibidores da PKC (queleritrina ou Go 6983). Além disso, o bloqueio da manutenção da LTP através da inibição da PKC também foi visto em neurônios da região CA1 (camada de células piramidais) do hipocampo (Reymann et al., 1988). Outro estudo de Weeber et al. (2000) em animais *knock-out* para o gene da PKC β foi verificado déficit de aprendizagem nesses animais submetidos ao condicionamento clássico aversivo e ao condicionamento contextual (metodologia de aprendizagem), apesar de não haver prejuízo na LTP e na transmissão sináptica no hipocampo, onde a expressão da PKC β é documentada.

Segundo Bonini et al. (2007) a utilização de um inibidor da cPKC e PKC μ prejudica a aquisição e consolidação da memória espacial no teste de aprendizagem em ratos no labirinto aquático de Morris, mostrando que a atividade dessas duas quinases é necessária na região dorsal CA1 do hipocampo para o processo de formação da memória espacial. Os autores ainda demonstraram que o inibidor induz uma amnésia de longa duração, sugerindo que é necessário e essencial um período de recuperação e ativação da PKC, sem utilização do inibidor, para a persistência da memória espacial.

Neste contexto, estudos que direcionam para investigação do papel da PKC na cognição, bem como, avaliação do efeito do tratamento crônico dos inibidores da PKC, Li, TMX e HP, se faz necessário elucidar o papel da PKC na cognição e memória.

1.5 DANO OXIDATIVO E INIBIDORES DA PKC

A PKC contém uma característica estrutural única que é susceptível a modificação oxidativa (Gopalakrishna et al., 2013). Um grande número de estudos científicos têm destacado a importância das espécies reativas de oxigênio (EROs) como um segundo mensageiro em numerosos processos celulares, incluindo proliferação celular, expressão gênica, adesão, diferenciação, senescência e apoptose (Cosentino-Gomes et al., 2012).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio persistente entre níveis de compostos antioxidantes e pró-oxidantes. O resultado deste fenômeno é a produção excessiva de radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Sies, 1991; Siwek et al., 2013). Em baixa, as concentrações fisiológicas das EROs podem funcionar como moléculas de sinalização desempenhando um papel importante na resposta imunológica e participando da regulação de várias atividades celulares (por exemplo, mitose). No entanto, em altas concentrações, as EROs pode levar a danos dos componentes da célula, incluindo proteínas (enzimas e receptores), lipídios e DNA. Isso consequentemente, podem levar à apoptose e morte celular (Halliwell, 2006; Halliwell, 2007; Halliwell e Lee, 2010; Halliwell, 2011; Steckert et al., 2012).

O sistema antioxidante é a principal linha de defesa contra o estresse oxidativo e pode ser dividido em sistema enzimático, compreendendo as enzimas chave SOD, CAT e GPx, e o sistema não enzimático (Halliwell, 2011). O mais importante antioxidante e regulador redox celular não-enzimático é a glutathiona reduzida (GSH), o antioxidante dominante no

encéfalo (Wood et al., 2009).

O aumento da atividade da SOD pode induzir ao dano celular, pois acelera a reação de formação de peróxido de hidrogênio e, consequentemente, o desequilíbrio entre a atividade da SOD e da CAT induzido a oxidação dos grupos sulfidrílicos e a peroxidação de lipídios insaturados, causando dano celular (Mayne, 2003; Steckert et al., 2010). Estudos apontam que, indivíduos com transtornos de humor, como TB, apresentaram defesas antioxidantes reduzidas ou hiperativas. Foram relatados tanto na depressão como no TB, alterações nas enzimas antioxidantes indicando um aumento da atividades da SOD (Andreazza et al., 2007; Gergerlioglu et al., 2007; Herken et al., 2007; Selek et al., 2008; Galecki et al., 2009) CAT (Andreazza et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007; Galecki et al., 2009), e GPx (Ozcan et al., 2004; Andreazza et al., 2007; Maes et al., 2011).

A mitocôndria possui papel fundamental na função neuronal, pois é através da fosforilação oxidativa que ela fornece a maior parte de energia para as células cerebrais. A disfunção da cadeia respiratória mitocondrial pode levar à produção excessiva de EROs. O excesso de EROs pode desencadear reações intracelulares que levam a um aumento na liberação de citocromo c, o qual ativa a pro-caspase-3, que por sua vez ativa a caspase-9, induzindo a apoptose da célula (Adam-Vizi e Chinopoulos, 2006). Outra rota de ativação de apoptose é via p53, ativada por dano ao DNA, com consequente ativação da Bax e liberação do citocromo c pela mitocôndria (Adams e Cory, 2007).

Muitos estudos têm fortemente sugerido a hipótese de uma ligação entre disfunção mitocondrial e o dano oxidativo em proteína, lipídio e ao DNA também observados na depressão e TB (Nicholls e Budd, 2000; Andreazza et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007; Kunz et al., 2008; Selek et al., 2008; Andreazza et al., 2009; Yumru et al., 2009; Steckert et al., 2010; Kasote et al., 2013; Varela et al., 2015). Esta hipótese foi corroborada por outros estudos, em que a administração de ouabaina (OUA) intraventricular em ratos causou uma série de alterações neuroquímicas observados em pacientes com TB, como o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e diminuição do BDNF no cérebro de ratos (Jornada et al., 2010).

Uma metanálise investigando marcadores de estresse oxidativo em TB demonstrou que as substâncias reativas ao TBARS, um marcador da peroxidação lipídica, e o NO, uma espécie reativa de nitrogênio, estavam significativamente aumentados em todas as fases do TB (Andreazza et al., 2008), sugerindo um papel relevante destes parâmetros como possíveis

biomarcadores-traço do transtorno.

No estudo de Sousa et al. (2014), foi demonstrado que o Li possui efeitos antioxidantes na prevenção da progressão do TB, pois este fármaco foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica (TBARS), o que também esteve associado à eficácia clínica desta medicação.

Além disso, estudos *post mortem* reportam alterações na atividade do complexo I mitocondrial (Andreazza et al., 2010) e níveis reduzidos de GSH (Gawryluk et al., 2011) no córtex frontal de pacientes com depressão maior.

Juntos esses estudos podem explicar, pelo menos em parte, a redução no volume de algumas regiões do cérebro, que é acompanhada pela atrofia e perda celular, observado em pacientes com TB (Drevets, 2001; Manji e Duman, 2001).

Outro estudo, investigou os efeitos da PKC usando o TMX, como inibidor da PKC, sobre os parâmetros de estresse oxidativo em um modelo animal de mania induzida por d-AMPH. Os resultados mostraram que o TMX reverteu e impediu os efeitos comportamentais induzidos pela d-AMPH. Além disso, a administração de d-AMPH induziu dano oxidativo em ambas as estruturas testadas em dois modelos. O TMX foi capaz de reverter e prevenir esse comprometimento, porém de forma dependente da área cerebral e técnica avaliada (Steckert et al., 2012).

El-Sherbiny et al. (2003), mostrou em um estudo de aprendizagem e comprometimento da memória, associado à alteração no estado de estresse oxidativo cerebral causado em ratos por injeção aguda de escopolamina (1,4 mg/kg). A injeção de escopolamina aumentou os níveis de MDA e a atividade da GPx do cérebro e também reduziu os níveis de GSH cerebral. O aumento do nível de GSH no cérebro pode diminuir diretamente o nível EROs. O pré-tratamento com HP (4, 8 e 12 mg), 30 minutos antes da injeção de escopolamina, mostrou atividade antioxidante através de seus efeitos sobre o nível de MDA e glutathiona.

Esses achados, demonstram que os inibidores da PKC, Li, TMX e HP podem proteger o cérebro contra danos oxidativos.

1.6 FATORES NEUOTRÓFICOS BDNF, GDNF, NGF E TRANSTORNOS MENTAIS

Os fatores neurotróficos são uma família de proteínas essenciais para a neurogênese, diferenciação, sobrevivência e crescimento neural (Bibel e Barde, 2000; Post, 2007). Diversos estudos têm demonstrado que a

sinalização PKC e as NTs desempenham um papel fundamental na modulação entre si. Alguns autores descreveram que a PKC, por diferentes vias, leva ao aumento da transcrição de RNAm para fatores neurotróficos, tais como o GDNF, BDNF, NGF e NT-3, em células do sistema nervoso (Lim e Alkon, 2012; Xu et al., 2013).

O fator de crescimento do nervo (NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada, por Levi-Montalcini, em 1951. Depois disso, vários estudos descobriram outras neurotrofinas, tais como BDNF e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), neurotrofina 3 (NT3), e neurotrofina 4 e 5 (NT-4/5). Todos estes fatores desempenham importantes papéis na plasticidade sináptica, arborização dendrítica e conectividade neuronal (Pfaffenseller et al., 2013).

As funções das NTs são reguladas por receptores da família tirosina-quinase (TrKA, TrKB e TrKC), embora possam se ligar com menor afinidade ao receptor p75NTR (membro da família do fator de necrose tumoral). O NGF interage com os receptores TrKA que é a molécula que desempenha um papel fundamental na regeneração de nervos periféricos e o BDNF ativa principalmente os receptores TrKB. A NT3 e a NT4/5 possuem ligação ao receptor TrKC (Sebben et al., 2011).

Entre as NTs, o BDNF é a mais abundante no SNC e parece induzir efeitos neurotróficos e neuroprotetores de longo prazo (Murer et al., 2001). Devido aos seus efeitos neuroprotetores, o BDNF é promissor como tratamento para doenças do SNC (Comim et al., 2013). Também é considerado a principal NT do cérebro, sendo produzido principalmente pela glia e pelos núcleos neuronais. O BDNF é altamente expresso no córtex cerebral e hipocampo, áreas do cérebro que são conhecidos para regular funções complexas do cérebro, tais como a memória e a emoção (Fernandes et al., 2014).

O BDNF é considerado molécula essencial no mecanismo de formação da LTP, mecanismo essencial na aprendizagem e memória. A LTP é um aumento duradouro na resposta excitatória pós-sináptica. A LTP é um processo ocasionado após estímulo repetido de mesma intensidade e duração (Minichiello, 2009; Fernandes et al., 2011). A administração exógena de BDNF em ratos geneticamente modificados deficientes de BDNF ou de seu receptor TrkB recuperam o processo da LTP (Patterson et al., 2001; Grande et al., 2010). Um estudo também mostrou a associação positiva entre os níveis séricos de BDNF e um teste de fluência verbal em humanos, sugerindo, a importância do BDNF em processos neurocognitivos (Dias et al., 2009). O BDNF é uma NT que está associada a depressão e as

respostas antidepressivas. De fato, um estudo prévio mostrou que a cetamina reverteu o aumento dos níveis de corticosterona e a diminuição dos níveis de BDNF em animais submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado (Garcia et al., 2009). Estudos pré-clínicos, demonstram que o tratamento crônico com antidepressivos e de estabilizadores do humor, como o Li e o valproato, são capazes de aumentar os níveis de BDNF no córtex frontal e no hipocampo de ratos (Frey et al., 2006a; Banasr e Duman, 2008; Jornada et al., 2010).

Alguns efeitos sinápticos importantes do BDNF são: aumenta de forma marcada a frequência espontânea de potenciais de ação nos neurônios do hipocampo; Potencia circuitos inibitórios e excitatórios através de mecanismos diferentes; Interfere na neuromodulação de inter-neurônios GABAérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos. Estes efeitos sinápticos acontecem independentemente da sua ação ser aguda ou prolongada (Manji et al., 2003; Tramontina et al., 2009). Os efeitos biológicos do BDNF são exercidos pela ativação de pelo menos três vias de sinalização intracelular diferentes: fosfatidil-inositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt), fosfolipase C (PLC) e ERK-cinase ativada por mitógeno (ERK/MAPK) (Bekinschtein et al., 2008).

Diversos estudos apontam que, os pacientes com TB, tanto na fase maníaca ou depressiva, apresentavam concentrações sanguíneas mais baixas de BDNF do que indivíduos saudáveis, e que as concentrações séricas de BDNF em pacientes eutímicos não foram significativamente diferentes das observadas em controles (de Oliveira et al., 2009; Fernandes et al., 2011; Fries et al., 2012; Gama et al., 2013; Roda et al., 2015). Estes resultados sugerem que, o BDNF do soro pode ser um potencial biomarcador de episódios agudos e há evidências de que o tratamento bem-sucedido da mania se associa com a normalização dos níveis desta neurotrofina (Tramontina et al., 2009).

Outra NT é o GDNF, considerado um dos mais potentes NT de neurônios dopaminérgicos, largamente encontrado nas regiões cerebrais, principalmente em regiões do estriato e áreas prosencefálicas (Airaksinen e Saarna, 2002).

Um estudo encontrou níveis plasmáticos de GDNF aumentados em pacientes eutímicos quando comparados a pacientes maníacos e controles (Barbosa et al., 2011b). Outro estudo observou níveis aumentados de GDNF em pacientes maníacos e depressivos, mas não em pacientes eutímicos quando comparados ao grupo controle (Rosa et al., 2006). Além disso, um estudo prévio encontrou níveis séricos de GDNF diminuídos em

pacientes durante a mania e a depressão, e níveis aumentados após a remissão dos sintomas (Zhang et al., 2010). Ao contrário, outro estudo mostrou níveis diminuídos de GDNF em pacientes com TB em remissão (Takebayashi et al., 2006). Portanto, há muitos resultados conflitantes sobre o papel do GDNF nas doenças mentais.

O GDNF também parece estar envolvido em processos cognitivos, visto que experimentos demonstram que mutações do GDNF em ratos mostraram uma anormalidade na transmissão sináptica no hipocampo e uma falha importante no processo de aprendizado espacial. Também, o GDNF exerce seus efeitos neurotróficos através da ativação de cascatas bioquímicas, como a MAPK, e proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), as quais estão fortemente envolvidas em processos cognitivos (Gerlai et al., 2001; Voikar et al., 2004).

A relação entre os fatores neurotróficos e a cognição e memória, e as alterações celulares, poderiam explicar ou elucidar as disfunções cognitivas, como dificuldade de atenção, aprendizado e memória, e dificuldade na funcionalidade psicomotora, apresentadas em pacientes com processos patológicos psiquiátricos, entre eles os transtornos de humor e TB (Martinez-Aran et al., 2004; Martinez-Aran et al., 2007; Lu et al., 2014).

O NGF é a NT mais pesquisada, descoberta há mais de 50 anos. Esta NT regula a sobrevivência, desenvolvimento e trofismo de populações neuronais específicas no SNC e sistema nervoso periférico (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968) apresentando elevada produção no córtex, hipocampo, pituitária e medula espinhal (Cirulli e Alleva, 2009).

Em estudos pré-clínicos foi demonstrado que, o comportamento do tipo maníaco são acompanhadas por níveis reduzidos ou aumentados de NGF no córtex frontal e do hipocampo de ratos (Frey et al., 2006a; Frey et al., 2006b; Jornada et al., 2010; Cechinel-Recco et al., 2012). Além disso, um estudo clínico mostrou que indivíduos com TB com episódios de mania apresentavam níveis mais baixos de NGF do que em pacientes ou controles eutímicos e que os níveis de NGF foram correlacionados negativamente com a gravidade da mania (Barbosa et al., 2011a).

Logo pode-se compreender, conforme os estudos acima descritos que, os níveis dessas NTs estão alterados no córtex frontal e hipocampo, reforçando o envolvimento dos NTs na fisiopatologia dos transtornos de humor e, portanto, são alvos para intervenções terapêuticas.

1.7 DIFERENÇAS SEXUAIS NA REPOSTA FARMACOLÓGICA

Nas últimas duas décadas, grande atenção está sendo dada às diferentes respostas neurobiológicas, psicológicas e psiquiátricas entre machos e fêmeas, ao curso de doenças e ao seu tratamento farmacológico. Neste contexto, uma maior compreensão de todos os aspectos do funcionamento neural só será alcançada incorporando o sexo como uma variável biológica (McCarthy, 2016). De modo semelhante ao humano, os modelos de roedores têm diferenças relacionadas ao sexo no seu comportamento e respostas farmacológicas (Becker e Koob, 2016).

Há algumas evidências que sugerem que homens e mulheres têm diferentes tipos de funções cognitivas e que existem diferentes níveis de estrogênio e testosterona entre os sexos no córtex, hipocampo e amígdala, regiões cerebrais responsáveis pela modulação da cognição e da memória. Isso poderia ser o responsável pelas diferenças na cognição observadas entre os sexos (Cahill, 2006; Cosgrove et al., 2007; Wilson e Davies, 2007). Portanto, é importante avaliar os efeitos de drogas tanto em animais machos quanto em fêmeas.

Existem fortes diferenças sexuais nas taxas de incidência de depressão, onde pelo menos duas vezes mais mulheres são afetadas que os homens (Angst et al., 2002; Gutierrez-Lobos et al., 2002). Do mesmo modo, a DA é mais prevalente em mulheres do que em homens (Baum, 2005), em contraste com outras formas de demência (Gao et al., 1998). As diferenças sexuais nestes distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos vão além das taxas de incidência. A manifestação de um transtorno pode variar de acordo com o sexo, onde no caso da depressão, as mulheres são mais propensas a serem diagnosticadas com depressão atípica e a apresentam maior risco para a ansiedade co-mórbida (Young et al., 1990; Angst et al., 2002; Silverstein, 2002). A gravidade da doença também está ligada ao sexo, como por exemplo a DA, que segue uma progressão mais grave em mulheres quando comparado aos homens (Irvine et al., 2012). Além do contexto da doença, existem diferenças sexuais em certos domínios de cognição, e na neurogênese (Galea et al., 2013).

Segundo o estudo de Vina e Borras (2010), as mulheres vivem mais que os homens. Além disso, as fêmeas vivem mais do que os machos em alguns, mas não em todos, animais experimentais. As diferenças na longevidade entre os sexos estão relacionadas à produção de radicais livres. Na verdade, as fêmeas produzem menos radicais apenas em espécies animais nas quais vivem mais do que os machos. Isso ocorre porque os

estrogênios regulam os genes antioxidantes associados à longevidade. Essas considerações levaram a postular um conceito ampliado de antioxidante na biologia: um antioxidante é qualquer manipulação nutricional, fisiológica ou farmacológica que aumenta a expressão e a atividade de genes ou proteínas antioxidantes.

Outro estudo importante sobre as diferenças sexuais, Demarest e McCarthy (2015) mostram que as diferenças sexuais na função neurocomportamental e cognitiva após várias formas de lesão do SNC são observadas na prática clínica e em estudos com animais. As fontes de diferenças sexuais incluem a exposição precoce aos hormônios gonadais, complacência cromossômica e modulação hormonal do adulto. Está se tornando cada vez mais evidente que o metabolismo mitocondrial e a morte celular são também sexualmente dimórficos. A disfunção metabólica mitocondrial é uma característica comum da lesão no SNC. Evidências sugerem que os machos predominantemente utilizam proteínas enquanto que as fêmeas usam predominantemente lipídios como fonte de combustível dentro das mitocôndrias e que essas diferenças podem afetar significativamente a sobrevivência celular após a lesão. Essas diferenças bioquímicas fundamentais têm um profundo impacto na produção de energia e em muitos processos celulares na saúde e na doença (Demarest e McCarthy, 2015).

Neste contexto, torna-se importante também avaliar os efeitos dos inibidores da PKC em machos e fêmeas, pois a resposta farmacológica pode ser diferente.

1.8 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a problemática do tratamento dos transtornos de humor, como o TB, com estabilizadores de humor clássicos, pois apresentam baixa adesão pelos pacientes, além de graves efeitos adversos dos mesmos, estudos acerca de novas abordagens terapêuticas são de extrema importância. Os inibidores da PKC são conhecidos pelos efeitos antimaníacos, porém há necessidade de maiores estudos sobre o efeito da sua administração crônica *per se*. Também importante observar as diferenças relacionadas ao sexo nas respostas farmacológicas para elucidar melhor o efeito destes fármacos, bem como sua segurança.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de inibidores da PKC (Li, TMX e HP) administrados cronicamente sobre o comportamento e alterações neuroquímicas cerebrais em ratos e ratas *Wistar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar os efeitos da administração crônica dos inibidores de proteína quinase C, Li, TMX, e HP, na atividade locomotora de ratos e ratas *Wistar*.

b) Avaliar os efeitos da administração crônica dos inibidores de proteína quinase C, Li, TMX e HP e Li no teste do nado forçado em ratos e ratas *Wistar*.

c) Avaliar os efeitos da administração crônica dos inibidores de proteína quinase C, Li, TMX e HP nos testes de memória (esquiva inibitória e reconhecimento de objetos) em ratos e ratas *Wistar*.

d) Avaliar os efeitos da administração crônica dos inibidores de proteína quinase C, Li, TMX e HP e Li nos testes de ansiedade (*Plus-Maze*) em ratos e ratas *Wistar*.

e) Avaliar os efeitos da administração crônica dos inibidores de proteína quinase C, Li, TMX e HP, nos parâmetros de dano oxidativo (níveis de carbonilação de proteínas e formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) no córtex frontal, estriado, hipocampo e núcleo accumbens de ratos e ratas *Wistar*.

f) Avaliar os efeitos da administração crônica dos inibidores de proteína quinase C, Li, TMX e HP nos níveis de BDNF, GDNF e NGF no córtex frontal e hipocampo de ratos e ratas *Wistar*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, protocolo 007/2013 (Anexo 1). Todos os experimentos deste projeto foram realizados no Laboratório de Neurociência da UNESC.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

No presente estudo, foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas (250-300g), com aproximadamente 60 dias, procedentes do biotério da UNESC. Os animais foram acondicionados em cinco por caixa, com ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00 h às 19:00 h) com comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Os procedimentos foram realizados entre 8:00 e 16:00 horas em uma sala, onde os animais estavam 30 minutos antes do experimento para se habituarem ao ambiente.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais receberam tratamento crônico, isto é foram administrado TMX, HP e Li, durante 28 dias e foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos de tratamento. Os fármacos utilizados no presente estudo foram: TMX (Fazenda Sandoz do Brasil Ltda, Paraná, Brasil), extrato seco de HP contendo 0,32% de hipericina total (Vitalis Farmácia de Manipulação, Criciúma, Santa Catarina, Brasil) e Li (Sigma, EUA, St. Louis), administrados por gavagem 1 vez ao dia (TMX e HP) ou 2 vezes ao dia (Li). As doses totais de TMX (1mg / kg), HP (5mg / kg), Li (47,5 mg / kg) foram baseadas em estudos anteriores (Valvassori et al., 2010; Cechinel-Recco et al., 2012; Galeotti et al., 2014). Os fármacos foram administrados em um volume constante de 1 mL/Kg de peso corporal do animal. O grupo controle recebeu água.

3.4 TAMANHO DA AMOSTRA

Nesse estudo foram utilizados 240 ratos *Wistar* fêmeas e machos. Os ratos *Wistar* foram randomizados em 4 grupos (n=10 por grupo): TMX, HP, Li e água. Sendo que, os testes comportamentais foram divididos em etapas: 1) Atividade locomotora (Campo Aberto) e Labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*); 2) Nado forçado e Esquiva inibitória; 3) Memória de habituação e Reconhecimento de objeto.

Cada etapa foi realizada com animais diferentes. Pelo fato de testes como nado forçado e esquiva inibitória serem procedimentos estressantes para os animais, impossibilita assim a realização de dois testes em um mesmo animal.

O número de animais por grupo (n) nos testes comportamentais é maior em relação às análises bioquímicas e imunoquímicas, em função da avaliação comportamental ter maiores variações de um animal para o outro quando comparado com as análises bioquímicas e imunoquímicas em que foi utilizado um n de 5 por grupo.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

O protocolo foi realizado durante 28 dias. Vinte e quatro horas após a última administração dos fármacos, foram avaliados nos animais: atividade locomotora, através do teste do campo aberto; memória aversiva, através do teste da esquiva inibitória; memória de reconhecimento de objetos, através do campo aberto; comportamento do tipo depressivo, através do teste do nado forçado e a ansiedade, através do teste do labirinto em cruz elevado. Após os testes comportamentais os animais foram mortos por decapitação, o cérebro retirado e fracionado em córtex frontal, hipocampo, estriado e núcleo accumbens para avaliação do dano oxidativo e dos níveis de BDNF, NGF e GDNF (Figura 3).

3.5.1 Teste do campo aberto (*Open Field*)

O teste do campo aberto fornece a oportunidade de avaliar sistematicamente a exploração de novos ambientes e a atividade locomotora geral em roedores (Prut e Belzung, 2003). Além disso, a exposição repetida proporciona um método para avaliar a habituação ao ambiente cada vez mais familiar (File, 1980; Prut e Belzung, 2003).

A atividade locomotora foi mensurada através do teste do campo aberto, executado em uma caixa de 40 x 60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada marrom, com uma parede de vidro frontal e assoalho dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para exploração da arena por cinco minutos, onde foram contados os cruzamentos feitos pelos ratos entre as linhas pretas em uma única sessão para **avaliação da atividade locomotora (Figura 4)**. Para a **avaliação de memória de habituação**, na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual exploraram livremente o ambiente por 5 minutos (sessão treino). Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual foi repetido o procedimento do treino. Durante 5 minutos, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal cruzava as linhas pretas (*crossings*) ou apoiava com as patas traseiras, levantando as dianteiras, atividade exploratória (*rearings*). A diminuição do número *crossings* e *rearings* entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de memória de habituação (Vianna et al., 2000).

3.5.2 Teste do Labirinto em cruz elevado (*elevated plus-maze*)

O labirinto em cruz elevado é um teste de ansiedade amplamente utilizado tanto para a descoberta de novos agentes ansiolíticos, quanto para investigar as bases psicológicas e neuroquímicas da ansiedade. Desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e posteriormente validado por Pellow et al. (1985), o modelo explora o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão ao medo natural que ratos apresentam a altura e espaços aberto.

Logo, o nível de ansiedade dos animais foi avaliado na tarefa do labirinto em cruz elevado (Figura 4). O labirinto consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) dispostos de forma perpendicular formando uma plataforma central (5 x 5 cm), com 50 cm de altura do chão (Pellow et al., 1985). Os experimentos foram conduzidos em sala escura com luz vermelha posicionada a 30 cm de altura da plataforma central do aparelho.

Os animais foram colocados no centro do labirinto, virado para o braço fechado, por cinco minutos. Os parâmetros avaliados foram: número de

entradas e o tempo de permanência no braço aberto ou no fechado, e número de entradas em cada um dos braços e as entradas totais (Pellow et al., 1985).

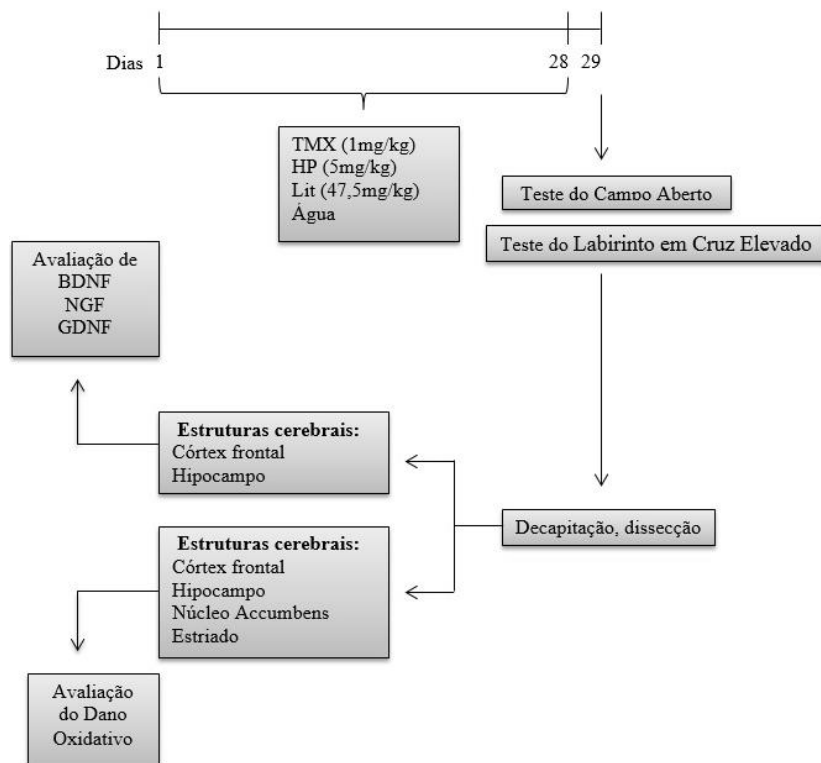


Figura 4 - Ilustração esquemática do protocolo experimental 1. Os ratos machos ou fêmeas receberam TMX, HP, Li ou água durante 28 dias. O teste de campo aberto e o teste de labirinto em cruz elevado foram realizados 24 h após a última administração. Após o teste de campo aberto e o teste de labirinto em cruz elevado, os ratos foram mortos por decapitação e o córtex frontal, hipocampo, núcleo accumbens e estriado foram dissecados. Logo após os animais foram submetidos a avaliação dos parâmetros de dano oxidativo. As avaliações das neurotrofinas: BDNF, NGF e GDNF foram realizadas com as estruturas córtex frontal e hipocampo. TMX = tamoxifeno, HP = *hypericum perforatum*; Li = lítio; BDNF = fator neurotrófico derivado do encéfalo; NGF – fator de crescimento do nervo; GDNF=fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia. Fonte: do autor.

3.5.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é um dos modelos mais tradicionais para o estudo da depressão em roedores, originalmente foi proposto por Porsolt et al. (1977). Este teste apresenta alto valor preditivo para a atividade antidepressiva devido a rápida resposta tipo-antidepressiva aos fármacos antidepressivos clássicos. Este teste consiste em dois dias de procedimentos no qual cada rato foi posto em um cilindro com água a 23°C e fundo suficiente para que o animal não consiga apoiar as patas no fundo. No primeiro dia, os ratos foram forçados a nadar por 15 minutos (sessão de treino). No segundo dia, (24 horas após o treino) cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos (sessão de teste).

Foram avaliados os parâmetros de imobilidade, nos quais incluem imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar, parâmetros de nado, que incluem movimentos horizontais através da superfície da água, e parâmetros de escalada, movimentos verticais contra as paredes (Porsolt et al., 1977) (Figura 5).

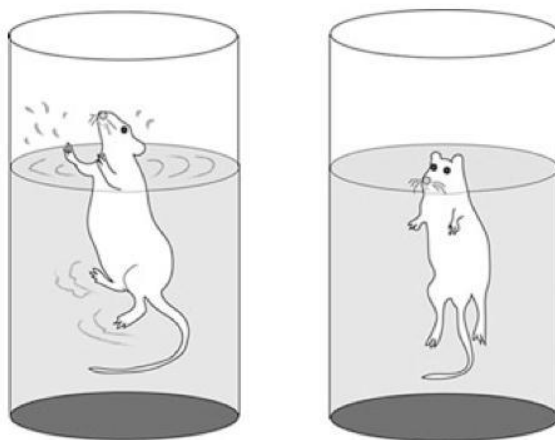


Figura 5 - Teste do nado forçado. O primeiro cilindro ilustra um animal durante a natação, enquanto o segundo cilindro ilustra um animal durante o período de imobilidade. Fonte: Valvassori (2014).

3.5.4 Teste de memória aversiva – esquiiva inibitória

A tarefa de esquiiva inibitória é um dos testes de memória mais utilizados e consiste em inibir a exploração do ambiente pela aplicação de choques no animal. O aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma (Gold, 1986) (Figura 6).

O aparelho é constituído por uma caixa medindo 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura. Parte do chão é formado por barras paralelas de metal (1mm de diâmetro) que se distanciam umas das outras por um espaço de 1 cm entre elas. Na parede esquerda do aparelho está inserida uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento.

Na sessão de treino, o animal foi colocado sobre a plataforma de frente para a parede traseira e, mediu-se o tempo que ele levou para descer, com as quatro patas, da plataforma. Esse tempo foi denominado “latência”. Imediatamente após o animal descer da plataforma, recebeu um choque nas patas de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e, então, foi medido o tempo que ele levou para descer, porém não foi administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de formação de memória. Foram realizadas 3 sessões de teste: 1) Imediatamente após o treino, para avaliar a memória imediata (MI); 2) 1,5 horas após o treinamento, para avaliar a memória de curto duração (MCD) e 3) 24 horas após a sessão de treino, para avaliar a memória de longo duração (MLD) (Izquierdo e Medina, 1991).

Nas sessões de teste, o procedimento foi repetido, porém não foi aplicado o choque nos animais. O tempo de latência para descer da plataforma foi usado como medida de retenção. Um limite de 180 segundos foi imposto sobre essa medida, ou seja, os animais que obtiveram uma latência no teste maior que 180 segundos, foram considerados como tendo uma latência de 180 segundos, como proposto anteriormente por Gold (1986) e Izquierdo e Medina (1997).

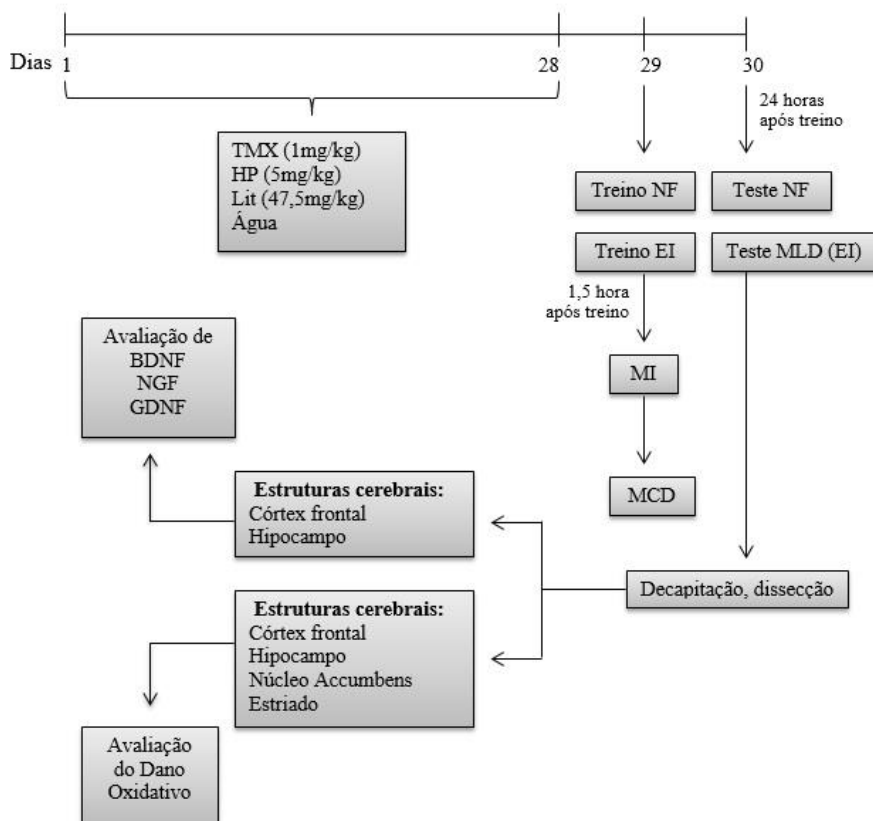


Figura 6 - Ilustração esquemática do protocolo experimental 2. TMX = tamoxifeno, HP = *Hypericum Perforatum*, Li = lítio, NF = nado forçado; EI= esquiva inibitória; MI = memória imediata, MCD = Memória de curta duração; MLD = Memória de longa duração. BDNF = fator neurotrófico derivado do encéfalo; NGF = fator de crescimento do nervo; GDNF=fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia. Fonte: do autor.

3.5.5 Teste de memória de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no campo aberto (descrito anteriormente). A tarefa de reconhecimento de objeto é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores,

que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido.

No 29º dia foi realizada a habituação ao campo aberto, o animal foi colocado no canto superior esquerdo na caixa e deixado por cinco minutos, sem nenhum objeto na caixa para que, o animal habitue-se ao ambiente (Figura 8).

Após 24 horas da habituação, na sessão treino, o animal foi recolocado no campo aberto, com dois objetos exatamente iguais (A1 e A2, sendo ambos cubos) exatamente no meio da caixa, paralelos e deixados por cinco minutos para que os animais explorassem o ambiente livremente. O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado, para posterior análise através do índice de reconhecimento.

No mesmo dia em 1 hora e 30 minutos, após a sessão de treino, foi avaliada a memória de curta duração, onde o animal foi recolocado na caixa, com dois objetos A1 e B1, com cores, tamanhos e formas diferentes, também para exploração por cinco minutos.

Para testar a memória de longa duração o animal foi recolocado na caixa, 24 h após a sessão de treino, com dois objetos, um que ele já estava familiarizado, A1, e um objeto totalmente distinto, C1, de todos os outros, em cor, forma e tamanho, e o animal durante cinco minutos explorou o novo ambiente (Izquierdo et al., 2006) .

Para a análise dos resultados foi usado o índice de reconhecimento que foi calculado pela fórmula $TB1 / (TA1 + T1B)$ onde TA é o tempo gasto para explorar um objeto familiar, que já foi conhecido do animal, e TB foi o tempo gasto para explorar o novo objeto (Ennaceur e Delacour, 1988) (Figura 7).

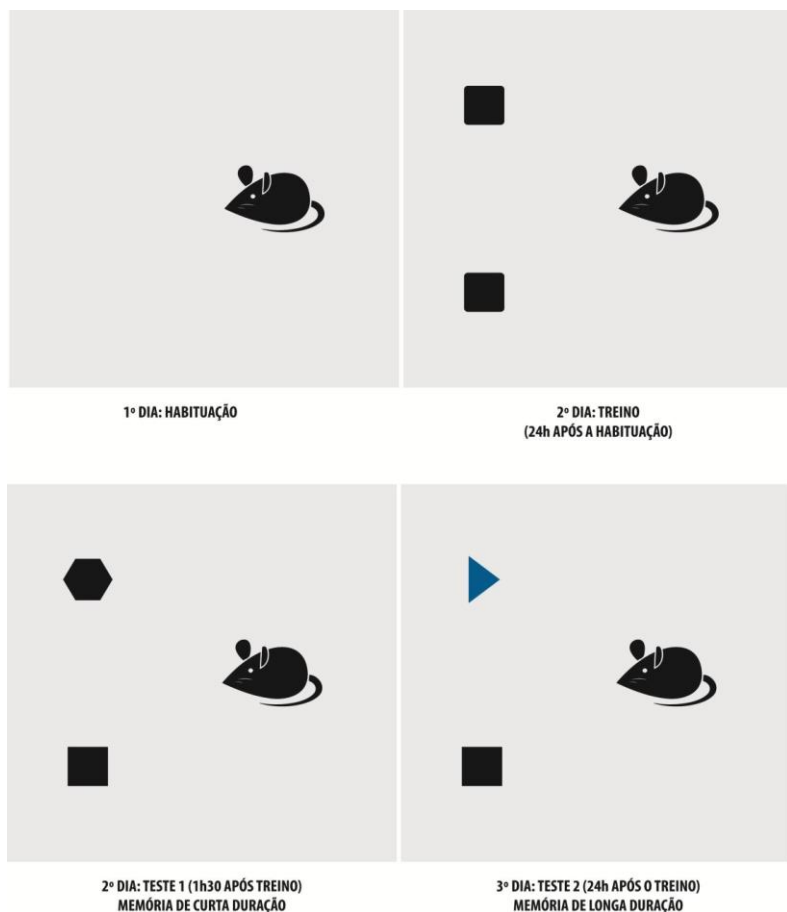


Figura 7 - Teste de reconhecimento de objeto. Primeiro quadrante representa o período de habituação. O segundo quadrante representa a sessão de treino quando o animal foi exposto a dois objetos iguais denominados A1 e A2. O terceiro quadrante representa o teste da memória de curta duração, realizado 1,5 horas após o treino onde o animal foi exposto a dois objetos diferentes na forma e igual na cor, sendo que um dos objetos foi idêntico ao objeto do treino, esses objetos foram denominados A e B. No último quadrante está representado o teste de longa duração, realizado 24 horas após o treino. O animal foi exposto a dois objetos, um idêntico ao objeto utilizado no treino e o outro diferente tanto na forma quanto na cor. Fonte: Valvassori (2014).

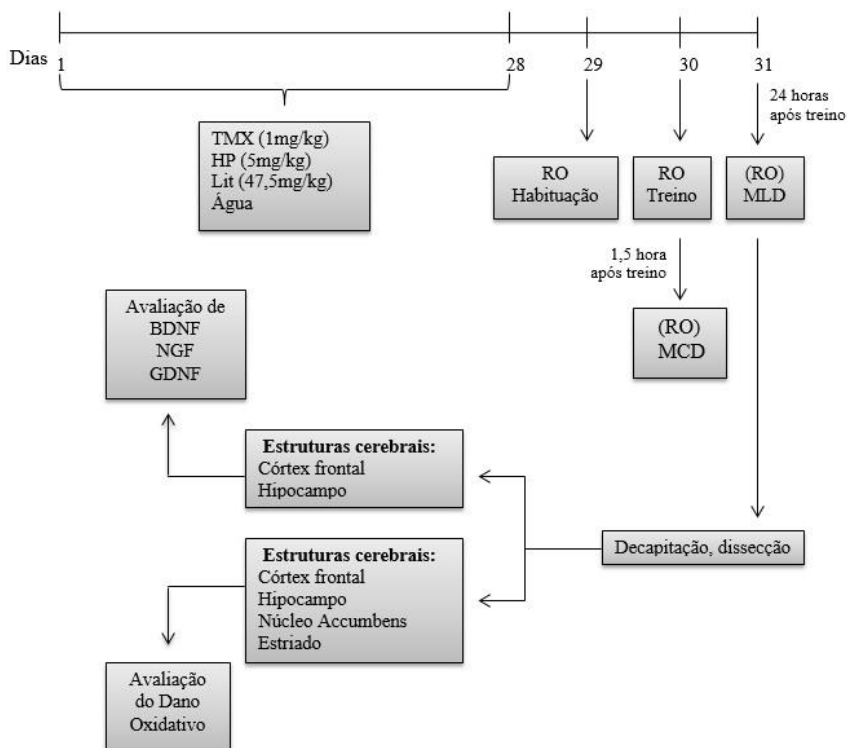


Figura 8 - Esquema do protocolo experimental 3. *TMX* = tamoxifeno, *HP* = *Hypericum Perforatum*, Li = lítio, RO = Reconhecimento de objetos; MCD = Memória de Curta Duração; MLD = Memória de longa duração. Fonte: do autor.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOQUÍMICAS

3.6.1 Preparo das amostras cerebrais

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram mortos por decapitação, o cérebro removido e dissecado em córtex frontal, hipocampo, núcleo accumbens e estriado de acordo com Glowinski e Iversen (1966). As amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até as avaliações serem realizadas, conforme os protocolos de análise bioquímica e imunoquímica descritos a seguir.

3.6.2 Mensuração do dano oxidativo

3.6.2.1 Avaliação dos níveis substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de TBARS (Esterbauer e Cheeseman, 1990). As amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas com solução tampão de fosfato (PBS) e lisadas. As espécies reativas foram obtidas por hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetra-etoxi-propano (TEP) e foram utilizadas como padrão para a quantificação de TBARS. A cada tubo foi adicionado TBA a 0,67% e em seguida foram agitados, o homogeneizado foi incubado a 90°C durante 20 minutos e posteriormente as amostras foram colocadas em gelo. A densidade óptica de cada solução foi medida em um espectrofotômetro a 535 nm. Os dados foram expressos como nmol de equivalente malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

3.6.2.2 Avaliação do conteúdo de grupos carbonilas

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil. O conteúdo de proteínas carboniladas foi medido nas amostras homogeneizadas de cérebro utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) em um ensaio espectrofotométrico (Levine et al., 1990; Levine et al., 1994). Amostras de tecidos foram sonicadas em homogeneização gelada de tampão contendo inibidores de fosfatase e de protease (200 nM caliculina, 10 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de aprotinina, 1 mM de ortovanadato de sódio e 1 µM microcistina-LR) e centrifugadas a 1000 x g durante 15 minutos para sedimentar o material insolúvel. Trezentos microlitros de alíquotas do sobrenadante contendo 0,7-1,5 mg de proteína foram tratados com 300 µl de 10 mM de DNPH, dissolvido em HCl a 2M, e comparado com 2M de HCl sozinho (reagente branco). Em seguida as amostras foram incubadas no escuro sob agitação a cada 10 minutos, durante uma hora e à temperatura ambiente. As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (concentração final de 20%) e centrifugadas a 16,000 x g a 4°C, durante 15 minutos. O sedimento foi lavado por três vezes com 1 ml de etanol/acetato de etila (1:1 v/v). Os sedimentos foram seguidamente agitados delicadamente em vórtice e após, expostos à solução de lavagem durante 10 minutos antes da centrifugação (16,000 x g, durante 5 minutos). O sedimento final foi dissolvido em 1 ml de guanidina 6M e 10

mM de tampão fosfato trifluoroacético ácido, pH 2,3. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 16,000 x g, por 5 minutos. Absorbância foi registrada em um espectrofotômetro a 370 nm, tanto para as amostras tratadas com DNPH, quanto para o HCl sem DNPH. Os níveis de proteínas carboniladas foram expressos como nmol de carbonil por mg de proteína.

3.6.3 Determinação de proteínas

Todas as medidas bioquímicas foram normalizadas para o teor de proteína com albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

3.6.4 Avaliação dos níveis cerebrais de BDNF, NGF e GDNF

Para a análise dos níveis de fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) os testes imunoquímicos foram realizados apenas com estruturas cerebrais dos animais que foram submetidos ao teste de campo aberto, devido às interferências dos outros testes que podem influenciar os resultados (esquiva inibitória: estímulo estressor e reconhecimento de objetos: tempo maior entre o fim do tratamento e a retirada de estruturas). Foram selecionadas, aleatoriamente, cinco amostras por grupo, de cada estrutura, e os níveis de BDNF, GDNF e NGF foram avaliados no hipocampo e córtex frontal. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em PBS com 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e 1 mM de ácido etilenoglico bis (2-éteraminoetil)-N, N, NONO-tetracético (EGTA) e avaliados através de ensaios de imuno ensaio enzimática (ELISA), utilizando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Chemicom, USA para NGF e BDNF; Biosensis, USA para GDNF). Microplacas (com 96 poços de fundo plano) foram incubadas durante 24 horas com amostras diluídas na concentração de 1:2 de *sample diluent* e a curva padrão variou de 7,8 a 500 pg de BDNF ou NGF. Então, as placas foram lavadas 4 vezes com *sample diluent*. O anticorpo monoclonal anti-rabbit para BDNF, anticorpo monoclonal anti-rabbit para NGF ou anticorpo policlonal anti-rabbit para GDNF diluídos em 1:1000 em *sample diluent* foi incubado durante três horas a temperatura ambiente. Após lavar, uma segunda incubação com anticorpo anti-rabbit de peroxidase conjugada diluída em 1:1000 foi realizada durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a adição de enzima estreptavidina, substrato e *stop solution*, a quantidade de BDNF, NGF e GDNF foi determinada por absorbância em 450nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre densidade óptica e a concentração de

BDNF, NGF e GDNF.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado, análises dos níveis de neurotrofinas (BDNF, NGF e GDNF) e parâmetros de dano oxidativo estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Os dados obtidos no teste de reconhecimento de objetos estão apresentados como média \pm EPM e as diferenças entre os grupos nessa análise comportamental foram verificadas usando ANOVA de uma via de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Os dados obtidos na tarefa de esquivas inibitória foram apresentados como medianas \pm intervalos interquartis (25 e 75). Estes dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney quando necessário. Em todas as comparações quando o $p < 0,05$, os resultados foram considerados significativos.

Os programas utilizados foram Statistical Package for the Social Science (SPSS) 20, Statistica 7, GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

A partir do teste do campo aberto, foi possível avaliar os efeitos da administração crônica com Li, TMX e HP sob a memória de habituação a partir dos parâmetros de atividade locomotora e exploratória em ratos machos e fêmeas. Conforme demonstrado na Figura 9A, não foram observadas diferenças no número de *crossings* [$F(3,34) = 2,11$, $p = 0,11$] e *rearings* [$F(3,34) = 1,85$, $p = 0,15$] em nenhum dos grupos avaliados. Este mesmo padrão comportamental ocorreu na avaliação das fêmeas [*Crossings*: $F(3,4) = 0,97$, $p = 0,39$; *Rearings* [$F(3,4) = 0,70$, $p = 0,50$], como demonstrado na Figura 9B.

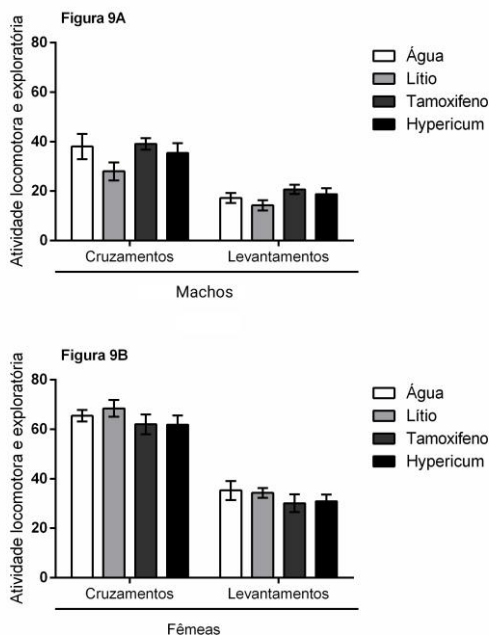


Figura 9 - Teste de campo aberto. Avaliação da atividade locomotora (cruzamentos) e exploratórias (levantamentos) em ratos machos (A) ou fêmeas (B) após administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum*. Os dados representam a média \pm EPM. $n = 10$. Fonte: do autor.

Para avaliar o comportamento do tipo ansioso, foram registrados os números entradas e do tempo gasto nos braços abertos e fechados com a utilização do teste do labirinto em cruz elevado. A administração crônica com Li, TMX ou HP em ratos machos (Figura 10A e 10B) ou fêmeas (Figura 10C e 10D) não afetou o número de entradas de braços abertos [Machos: $F(3,43) = 0,69$, $p = 0,56$; Fêmeas: $F(3,36) = 1$, $p = 0,4$], fechados [Machos: $F(3,43) = 1,08$, $p = 0,37$; Fêmeas: $F(3,36) = 0,52$, $p = 0,67$], total de entradas [Machos: $F(3,43) = 0,47$, $p = 0,70$; Fêmeas: $F(3,36) = 0,97$, $p = 0,42$] ou o tempo gasto em braços abertos [Machos: $F(3,43) = 1,94$, $p = 0,14$; Fêmeas: $F(3,36) = 0,61$, $p = 0,61$] e fechados [Machos: $F(3,43) = 1,11$, $p = 0,35$; Fêmeas: $F(28,11) = 0,85$, $p = 0,65$].

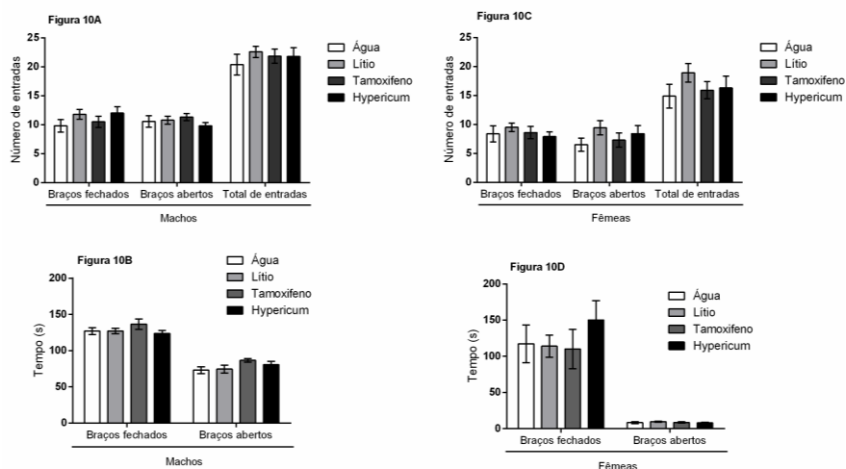


Figura 10 - Teste do labirinto em cruz elevado. Avaliação dos parâmetros de ansiedade. Registraram-se o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado. O teste comportamental foi realizado em ratos machos (A, B) e fêmeas (C, D), após administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum*. Os dados representam a média \pm EPM. $n = 10$. Fonte: do autor.

Com a realização do teste do nado forçado foi possível avaliar comportamento do tipo depressivo a partir do registro do tempo de imobilidade dos animais. A administração crônica com Li, TMX ou HP em

ratos machos [$F(3,50) = 0,34$, $p = 0,80$] (Figura 11A) ou fêmeas [$F(3,34) = 0,78$, $p = 0,51$] (Figura 11B) não alterou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

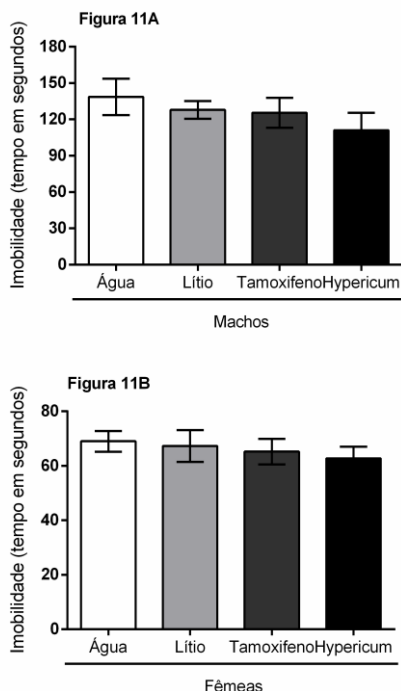


Figura 11 - Teste do nado forçado. Tempo de imobilidade registrado e tomado como medida de comportamento depressivo em ratos machos (A) e fêmeas (B), após administração crônica com lítio, tamoxifeno, ou *hypericum perforatum*. Os dados representam a média \pm EPM. $n=10$. Fonte: do autor.

A aplicação do teste de memória de reconhecimento de objetos avaliou as alterações cognitivas, que podem ser associadas com tratamentos medicamentosos. Em todos os protocolos experimentais (usando machos ou fêmeas), não houve diferenças entre os grupos no tempo total de exploração em ambos os objetos no treino. Além disso, também não houve diferença no desempenho entre os grupos nesta sessão. Esses resultados indicam que a administração pré-treino com Li, TMX ou HP não afetou parâmetros

sensorio-motor, como locomoção e motivação. Ratos, machos (Figura 12A) ou fêmeas (Figura 12B), que receberam TMX ou HP, mas não com Li [Macho: $F(2,21) = 87,54$, $p < 0,001$; Fêmea: $F(2,21) = 188,54$, $p < 0,001$], mostraram retenção de memória prejudicada (MCD e MLD) [Macho: $F(4,42) = 39,33$, $p < 0,001$; Fêmea: $F(4,42) = 55,64$, $p < 0,001$], como mostrado pela preferência diminuída para o novo objeto em comparação com os controles que receberam água. Apesar de mostrarem uma diminuição no índice de reconhecimento durante MCD e MLD, os ratos machos mostraram uma preferência maior para o novo objeto durante as sessões de teste em comparação com treino. No entanto, as fêmeas que receberam TMX ou HP não mostraram preferência significativa pelo novo objeto durante os testes MCD e MLD.

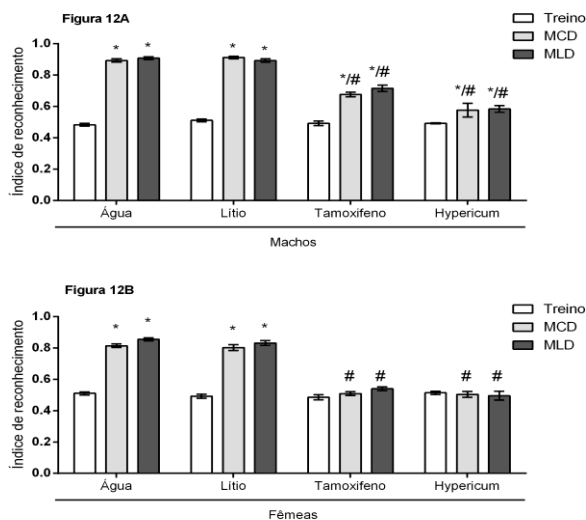


Figura 12 - Teste de reconhecimento de objetos (RO). Avaliação da memória de reconhecimento. Índice de reconhecimento dos objetos nas sessões de treinamento e teste para ratos machos (A) e fêmeas (B) que receberam os fármacos lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum*. Os resultados são apresentados como médias \pm EPM do índice de reconhecimento. A sessão de teste foi realizada 24 horas após a sessão de treinamento. * $p < 0,001$ diferente do teste de treinamento. # $p < 0,01$ diferente do grupo controle, de acordo com ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. $n = 10$. MCD = Memória de curta duração/ MLD = Memória de Longa Duração. Fonte: do autor.

A tarefa da esQUIVA inibitória é um teste comportamental amplamente utilizado para estudar os efeitos de fármacos sob a memória aversiva. Com a realização do teste da esQUIVA inibitória foi possível observar que, em ambos os sexos, os grupos controle e HP apresentaram maior latência nos testes MCD e MLD quando comparados com a sessão de treino, indicando a aquisição de memória. No entanto, a administração crônica com HP induziu prejuízo na aquisição de memória em ratos machos (Figura 13A) e fêmeas (Figura 13B), uma vez que as latências nas sessões de teste foram diminuídas tanto para MCD como para MLD, em comparação com o grupo controle. É importante notar que a administração de HP em ratos fêmeas também induziu prejuízo na MI, uma vez que as latências entre as sessões de treino e de teste não foram estatisticamente diferentes.

Os dados do teste estatístico de Wilcoxon para a sessão de treinamento *versus* sessões de teste para o grupo de controle [Treino *versus* MI de macho: $Z = 2,524$, $p = 0,012$; treino *versus* MI de fêmea: $Z = 2,106$, $p = 0,035$; Treino *versus* MCD de macho: $Z = 2,521$, $p = 0,012$; Treino *versus* MCD de fêmea: $Z = 2,521$, $p = 0,012$; Treino *versus* MLD de macho: $Z = 2,524$, $p = 0,012$; Treino *versus* MLD de fêmea: $Z = 2,38$, $p = 0,017$], e para o grupo HP [treino *versus* MI de macho: $Z = 2,934$, $p = 0,003$; Treino *versus* MI de fêmea: $Z = 1,557$, $p = 0,119$; Treino *versus* MCD de macho: $Z = 2,936$, $p = 0,003$; Treinamento *versus* MCD de fêmea: $Z = 2,314$, $p = 0,021$; Treino *versus* MLD de macho: $Z = 2,803$, $p = 0,05$; Treino *versus* MLD de fêmea: $Z = 2,845$, $p = 0,004$].

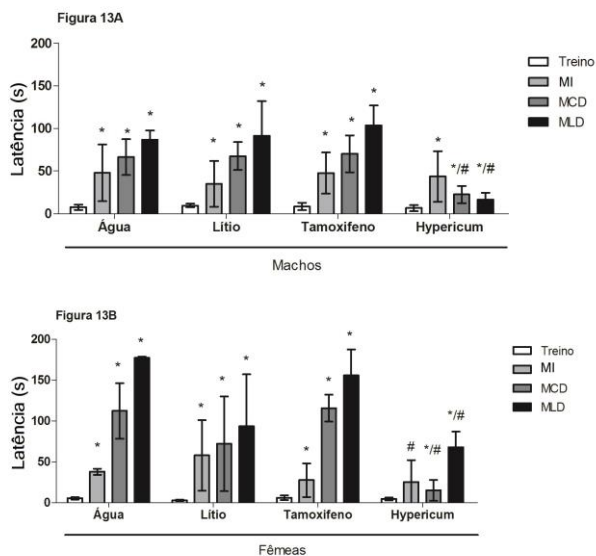


Figura 13 - O teste de esQUIVA inibitória foi utilizado para avaliação da memória aversiva. O tempo de latência foi registrado nas sessões de treinamento e teste para ratos machos (A) e fêmeas (B) que receberam lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum*. Os resultados são apresentados como medianas \pm intervalos interquartis (25 e 75). A sessão de teste foi realizada 24 horas após a sessão de treinamento. * $p < 0,001$ diferente do teste de treinamento. # $p < 0,01$ diferente do grupo controle, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney. $n = 10$. MI = Memória Imediata/ MCD = Memória de curta duração/ MLD = Memória de longa duração. Fonte: do autor.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOQUÍMICASA

Administração crônica com HP diminuiu os níveis de BDNF no hipocampo de ratos machos ($F(8) = 2,29$, $p < 0,001$) (Figura 14A) e fêmeas ($F(8) = 3,59$, $p < 0,01$) (Figura 14B), mas não no córtex frontal [Macho: $F(8) = 2,08$, $p = 0,79$; Fêmea: $F(8) = 3,59$, $p = 0,36$].

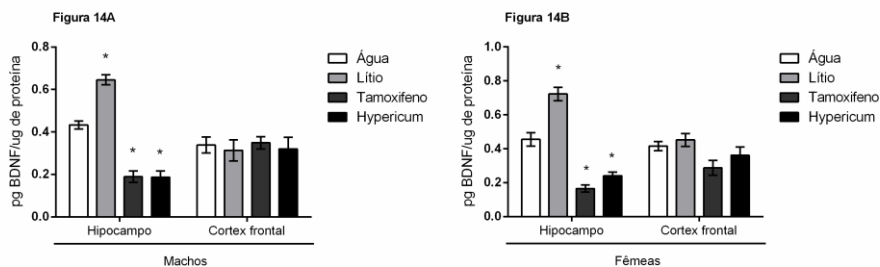


Figura 14 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* nos níveis de proteína BDNF no hipocampo e córtex frontal de ratos machos (A) e fêmeas (B). Os dados representam a média \pm EPM * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. $n = 10$. Fonte: do autor.

A administração crônica com HP diminuiu os níveis de NGF no hipocampo de fêmeas ($F(8) = 1,41$, $p < 0,001$) (Figura 15A). Não foram observadas alterações nos níveis de NGF no hipocampo de machos ($F(8) = 1,16$, $p = 0,76$) ou córtex frontal de machos ($F(8) = 1,47$, $p = 0,68$) e fêmeas ($F(8) = 3,95$, $p = 0,14$) após receberem HP (Figura 15B).

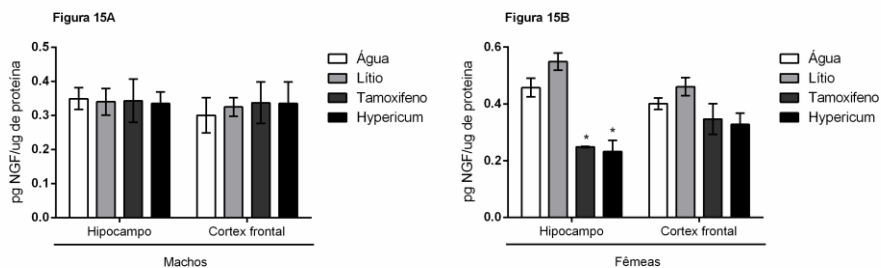


Figura 15 – Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* níveis de NGF no hipocampo e córtex frontal em ratos machos (A) e fêmeas (B). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. $n = 10$. Fonte: do autor.

A administração crônica com HP em ratos machos (Figura 16A) ou fêmeas (Figura 16B) não alterou os níveis de GDNF no hipocampo

[Macho: $F(8) = 1,50$, $p = 0,54$; Fêmea: $F(8) = 3,06$, $p = 0,83$] ou córtex frontal [Macho: $F(8) = 1,50$, $p = 0,69$; Fêmea: $F(8) = 4,29$, $p = 0,16$].

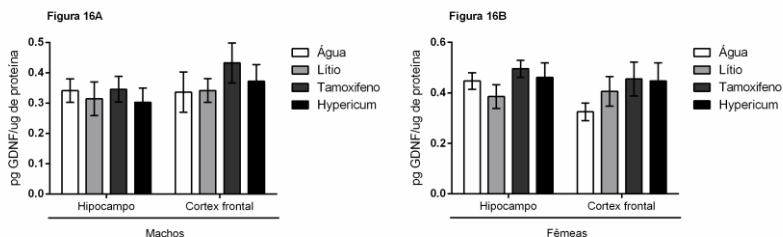


Figura 16 – Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* nos níveis de GDNF no hipocampo e córtex frontal de ratos machos (A) e fêmeas (B). Os dados representam a média \pm EPM. $n = 10$. Fonte: do autor.

Para a avaliação do dano oxidativo foram avaliados os níveis de TBARS (Figura 17) e o conteúdo de grupamentos carbonil (Figura 18). Os níveis de TBARS não apresentaram alteração em qualquer estrutura cerebral de ratos machos em todas as estruturas cerebrais avaliadas (Figura 17A). Os dados estatísticos da ANOVA de uma via são: [córtex frontal: $F(3,19) = 1,97$, $p = 1,015$; Hipocampo: $F(3,16) = 0,33$, $p = 0,80$; Estriado: $F(3,19) = 0,14$, $p = 0,93$; Núcleo accumbens: $F(3,21) = 0,14$, $p = 0,93$]. Contudo, como pode ser observado na Figura 17B, a administração com Li, reduziu o nível de TBARS no córtex frontal e estriado em fêmeas. A administração com HP reduziu os níveis de TBARS no hipocampo, núcleo accumbens e estriado. TMX reduziu no núcleo accumbens e estriado, quando comparado ao grupo controle. A ANOVA de uma via demonstrou diferença no córtex frontal [$F(3,14) = 3,95$, $p < 0,05$], estriado [$F(3,14) = 23,81$, $p < 0,01$], hipocampo [$F(3,14) = 4,11$, $p < 0,05$] e, núcleo accumbens [$F(3,14) = 6,79$, $p < 0,01$].

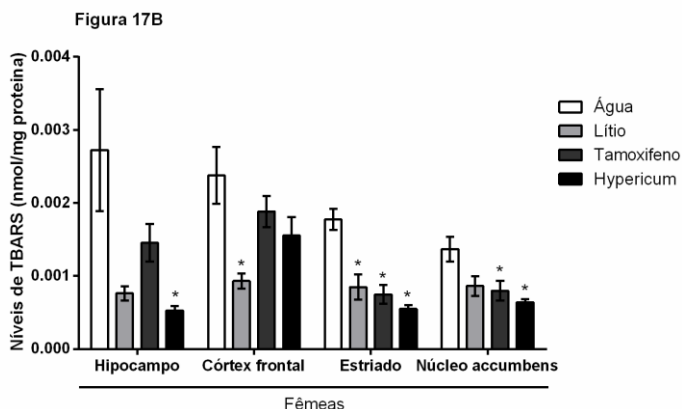
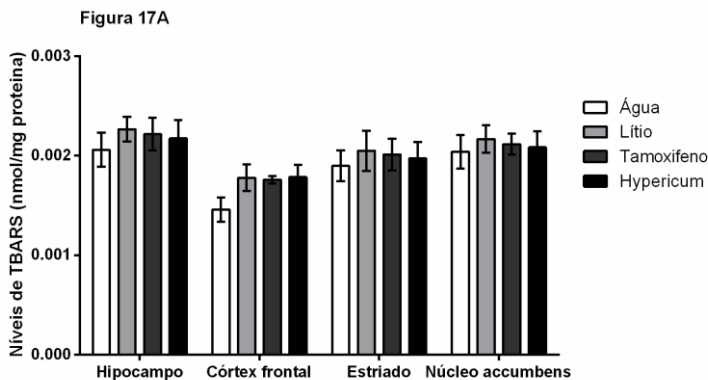


Figura 17 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou administração de *hypericum perforatum* em níveis de TBARS de machos ($n = 3-7$) (A) e fêmeas ($n = 3-5$) (B). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de um via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Fonte: do autor.

Em ratos machos não foi encontrada diferença estatística para a avaliação dos níveis de conteúdo de grupamentos carbonil (Figura 18A). Os dados da ANOVA de uma via: [córtex frontal: $F(3,19) = 1,18$, $p = 0,34$; Hipocampo: $F(3,16) = 3,14$, $p = 0,05$; Estriado: $F(3,19) = 0,23$, $p = 0,87$; Núcleo accumbens: $F(3,21) = 0,17$, $p = 0,92$]. No entanto, conforme ilustrado na Figura 18B, a administração com Li reduziu esses níveis no córtex frontal e

estriado. Além disso Li aumentou no núcleo accumbens. A administração crônica com HP reduziu os níveis de grupos carbonil no córtex frontal e estriado; além disso, a administração com TMX reduziu no córtex frontal. A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa no córtex frontal [$F(3,14) = 9,06$, $p < 0,01$], estriado [$F(3,12) = 9,19$, $p < 0,01$] e no núcleo accumbens [$F(3,14) = 6,39$, $p \leq 0,01$], mas não no hipocampo [$F(3,14) = 1,32$, $p = 0,30$].

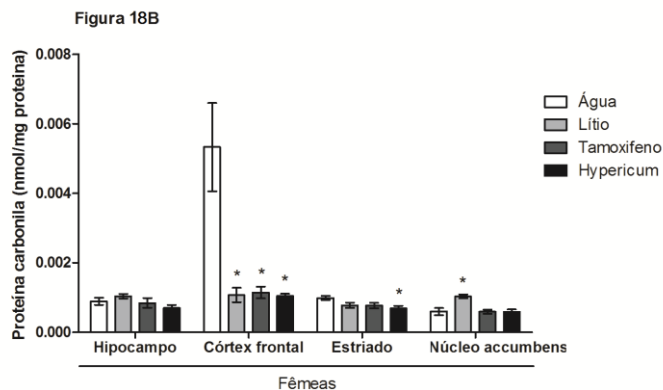
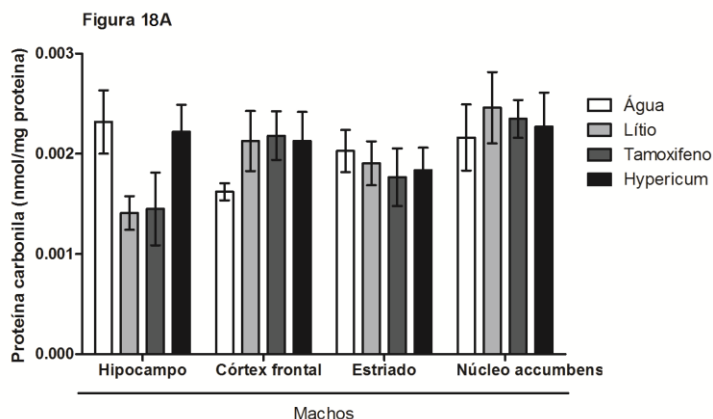


Figura 18 - Efeitos da administração crônica com lítio, tamoxifeno ou *hypericum perforatum* em relação ao conteúdo de grupamentos carbonil de machos ($n = 3-7$) (A) e fêmeas ($n = 3-5$) (B). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ de acordo com a ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey. Fonte: do autor.

5 DISCUSSÃO

O TMX e o HP são inibidores da PKC e tem efeito no TB, depressão e outras doenças mentais. Portanto, avaliou-se a segurança da administração crônica desses fármacos e comparou-se com Li, que é a droga clássica para TB, já que estes fármacos estão sendo investigados como papel terapêutico potencial no TB. Avaliou-se o comportamento cognitivo e não cognitivo, dano oxidativo e os níveis de fatores neurotróficos em ratos *Wistar* machos e fêmeas. Entretanto, de modo semelhante ao humano, os modelos de roedores têm diferenças relacionadas ao sexo no seu comportamento e respostas farmacológicas (Becker e Koob, 2016) por isso o interesse deste trabalho na avaliação da resposta farmacológica entre os sexos.

Os resultados mostraram que a administração crônica (28 dias) de Li (47,5 mg/kg), TMX (1 mg/kg) e HP (5 mg/kg) não alterou os comportamentos não-cognitivos: atividades locomotora e exploratória, comportamentos ansiosos e depressivos - em ratos machos e fêmeas. Alguns estudos do laboratório de neurociências da UNESC mostraram que o tratamento sub-crônico (7 ou 14 dias por via intraperitoneal) com Li (47,5 mg/kg/duas vezes ao dia) ou TMX (1 mg/kg/duas vezes ao dia), na mesma dose utilizada no presente estudo, não alterou a atividades locomotora e exploratórias (Moretti et al., 2011; Cechinel-Recco et al., 2012; Steckert et al., 2012). Em outro experimento pré-clínico, os autores também mostraram que 7 dias de tratamento com HP (300 mg/kg na água potável) não houve alteração da atividade locomotora (Reis et al., 2013). Juntos, estes estudos sugerem que estes fármacos não têm efeitos sobre a atividade locomotora e exploratória.

Diferentemente do presente estudo, Abrial et al. (2013) mostraram que o tratamento sub-crônico com TMX (10 mg/kg/dia, i.p., durante 14 dias) induziu comportamento depressivo no teste do nado forçado e redução da proliferação celular no giro denteado do hipocampo. De fato, o TMX, que é utilizado no tratamento do câncer da mama, provoca frequentemente uma série de efeitos adversos, incluindo o desenvolvimento de episódios depressivos maiores (Lee et al., 2007; De Berardis et al., 2014). É importante enfatizar que, no estudo de Abrial et al. (2013) e na clínica, a dose de TMX utilizada é 10 vezes maior que a dose utilizada no presente estudo, sugerindo que somente doses mais altas deste fármaco podem induzir o comportamento tipo depressivo.

Em relação ao HP, há um número importante de estudos mostrando os efeitos antidepressivos e ansiolíticos dessa planta. Um estudo pré-clínico mostrou que o HP tem efeito antidepressivo em camundongos e níveis

significativamente aumentados de neurotransmissores cerebrais, especialmente a 5HT (Kulkarni et al., 2012). Um estudo anterior também mostrou atividade antidepressiva de HP no teste do nado forçado e teste de suspensão pela cauda, sugerindo que a dopamina é importante para a atividade deste extrato (Butterweck et al., 1997). Além disso, Gambarana et al. (1999) mostraram que HP agudo protegeu os animais dos efeitos do estresse. No mesmo estudo, o HP reverteu o déficit de fuga mantido por estressores repetidos e preservou a capacidade de aprendizagem do animal para ganhar um reforçador positivo. A partir desses resultados, os autores concluíram no artigo que o HP possui atividade antidepressiva.

Mais uma vez, diferentemente do presente estudo, Flausino et al. (2002) mostraram que o HP (125 mg/kg) prejudicou a esQUIVA inibitória nos braços abertos no teste do labirinto em T elevado, um efeito ansiolítico, sem alterar o desempenho de fuga. No mesmo estudo, os autores mostraram que, similarmente a imipramina, o extrato desta planta aumentou o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro/escuro. Outro estudo pré-clínico mostrou que a administração repetida de HP (300 mg/kg) induziu efeitos ansiolíticos, por diminuição da esQUIVA inibitória, e um efeito antipânico, pelo aumento da fuga unidirecional (Beijamini e Andreatini, 2003). Juntos, esses estudos sugerem que, dependendo da metodologia de tratamento, o HP pode exercer efeito ansiolítico.

O efeito antidepressivo e ansiolítico do HP pode ser explicado pela sua ação farmacológica, uma vez que inibe a recaptação de serotonina, norepinefrina e dopamina (Muller et al., 1997). Portanto, apesar de HP inibir PKC; tem também um papel importante nos sistemas monoaminérgicos, proporcionando os efeitos antidepressivos desta planta. No presente estudo, o HP não mostrou alterações comportamentais no nado forçado e no labirinto em cruz elevado, testes comportamentais utilizados para avaliação de comportamentos antidepressivos e ansiolíticos, respectivamente. Esta discrepância pode ser explicada por diferenças na metodologia, desenho experimental, dose, tempo de tratamento e espécie animal. É importante ressaltar que este é o primeiro estudo avaliando o tratamento crônico (28 dias) com esta planta e o efeito agudo pode demonstrar efeito completamente diferente do crônico.

No presente estudo, Li não apresentou alterações comportamentais no teste do nado forçado e no labirinto em cruz elevado. Alguns estudos corroboram com os resultados do presente trabalho. Hata et al. (1995) demonstraram que uma dose única (100 ou 200 mg/kg) ou administração

repetida (seis dias, 50 ou 60 mg/kg) de Li não alterou a imobilidade no teste do nado forçado. Além disso, outros estudos mostraram que a administração subcrônica de Li (cinco dias, 60 mmol/kg na ração alimentar) não alterou este parâmetro (Wegener et al., 2003). Kitamura et al. (2002) também mostraram que uma única administração de Li em três concentrações diferentes (10, 30 ou 100 mg/kg) não alterou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Da mesma forma, Liu et al. (2013) mostraram que uma única injeção de Li *per se* não foi capaz de alterar o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. No entanto, em um estudo recente, o Li na dose de 36,94 mg/kg, durante 14 dias, reduziu o comportamento de imobilidade no teste do nado forçado (Nadeem et al., 2015). Alguns estudos demonstraram que a administração crônica (21 dias ou mais) de Li não altera a ansiedade, parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado em ratos. Pezzato et al. (2015) descobriram que o Li não alterou o número total de entradas e a percentagem de entradas em braços abertos. Zhou et al. (2015) mostraram que o Li não alterou as entradas e o tempo gasto em braços abertos. Juntos, esses estudos sugerem que o Li não alterou os comportamentos de depressão e ansiedade, quando avaliados no teste do nado forçado e labirinto em cruz elevado, respectivamente.

No presente estudo, o Li não alterou parâmetros comportamentais nos testes de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos. Corroborando os experimentos do presente estudo, algumas evidências demonstram que o tratamento com o Li, além de não alterar parâmetros comportamentais relacionados a memória, reverteu alguns déficits cognitivos (Contestabile et al., 2013). Como demonstrado no estudo de Contestabile et al. (2013), no qual camundongos *knock-out* modelo Ts65Dn (trissomia parcial do cromossomo 16), um modelo de Síndrome de Down, tratados com Li demonstraram um aumento da habilidade de discriminação de objetos novos em relação a objetos conhecidos, quando comparados com camundongos do mesmo modelo, tratados com água (controle), além de promover um aumento de células neuronais.

No presente estudo, ratos machos ou fêmeas tratados com TMX ou HP apresentam comprometimento na retenção (MCD e MLD), como demonstrado pela preferência diminuída pelo objeto novo, quando comparado com os controles. Além disso, o tratamento com HP induziu comprometimento na aquisição de memória aversiva em ratos machos e fêmeas, uma vez que, no teste de esquiva inibitória, houve uma diminuição na latência (tempo) dos testes, tanto para MCD como para MLD. Além

disso, a administração de HP em fêmeas, também induziu um dano na IM, uma vez que não houve diferenças significativas entre as latências das sessões de treino e de teste (as fêmeas não aprenderam).

De acordo com os resultados do presente trabalho, um estudo anterior demonstrou que a administração repetida de TMX em camundongos machos produz deficits na aquisição ou retenção de respostas aprendidas, quando submetidos a um procedimento de aprendizagem chamado *autoshaping* – resposta dos animais a um “puxão” no nariz, um teste experimental usado para estudar condicionamento clássico (Walker et al., 2011). Um estudo clínico mostrou que o tratamento a longo prazo com TMX, em mulheres em pós menopausa e com câncer de mama, prejudica domínios cognitivos que dependem de habilidades verbais (memória verbal e fluência) (Boele et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que os pacientes com câncer de mama que utilizaram TMX têm consideráveis deficiências relacionadas ao processo de tomada de decisão. Ainda neste estudo, os autores sugerem que o TMX pode levar a alterações cognitivas, pelo seu papel antagonista nas áreas do cérebro onde há presença de receptores estrogênio, incluindo o córtex frontal, o hipocampo e a amígdala (Chen et al., 2014). De fato, existe um conjunto de evidências demonstrando que pacientes em tratamento com TMX têm comprometimento, um déficit na memória verbal (Shilling et al., 2003; Schilder et al., 2009) e na função executiva (Schilder et al., 2010), habilidade visuoespacial e velocidade de processamento (Schilder et al., 2010), capacidade e velocidade de processamento (Shilling et al., 2003; Palmer et al., 2008), quando comparado aos controles saudáveis.

Está bem descrito na literatura que o TMX é um antagonista competitivo no receptor do estrogênio (ER) (Coezy et al., 1982; Willson et al., 1994). As evidências indicam que o estrogênio tem a capacidade de regular várias funções neuronais, incluindo a aprendizagem e a memória (McEwen e Alves, 1999; McEwen et al., 2012). Esta capacidade é atribuída às funções do receptor de estrogênio α associado à membrana (ER α) e receptor do estrogênio β (ER β), bem como o novo receptor sensível ao estrogênio acoplado a proteína G (GPER1) (Walf et al., 2006; Liu et al., 2008; Walf et al., 2008). Hammond et al. (2009) demonstraram que GPER1 através da ativação do agonista de estrogênio tem um efeito benéfico sobre a função cognitiva e que os antagonistas dos ER têm efeitos deletérios nas funções cognitivas. De fato, foram demonstradas deficiências nas memórias de trabalho e espacial em ratas ovariectomizadas (Daniel et al., 1997; Gibbs e Johnson, 2008). O tratamento agudo com estrogênio reverteu os deficits

cognitivos induzidos pela ovariectomização (Daniel et al., 1997; Gibbs e Johnson, 2008). Por conseguinte, pode sugerir-se que o TMX pode prejudicar a memória de reconhecimento através da inibição do ER. Além disso, o presente estudo também demonstrou que os déficits de memória induzidos por TMX foram maiores em fêmeas. Isso pode ser explicado pelo fato de que machos e fêmeas têm diferentes tipos de funções cognitivas e as diferenças sexuais na cognição estão associadas com os níveis de estrogênio e testosterona nas regiões do cérebro importantes para a cognição e memória, como o córtex, hipocampo e amígdala (Cahill, 2006; Cosgrove et al., 2007; Wilson e Davies, 2007).

É interessante notar que no presente estudo, o dano cognitivo foi observado no teste de reconhecimento de objetos após o tratamento com TMX, mas não no teste de esQUIVA inibitória. Aprendizagem e memória não são um processo único, e sua formação envolve vários processos complexos dentro do sistema nervoso (Smid e Vet, 2016). O processo de "memória/aprendizagem do medo" avaliado no teste de esQUIVA inibitória é a memória mais forte e mais duradoura, devido a carga emocional elevada entre a aquisição de memória e a posterior consolidação e reconsolidação pós-treino (Izquierdo et al., 2016). Portanto, o comprometimento deste tipo de memória é mais difícil de induzir do que na memória de reconhecimento.

No presente estudo, demonstrou-se que a administração de HP produziu um déficit cognitivo, em ratos machos e fêmeas nos testes de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória. Além disso, o dano cognitivo foi mais significativo nas fêmeas do que em machos. Um estudo pré-clínico avaliando parâmetros cognitivos, através do teste do labirinto aquático, na prole de camundongos tratados com HP evidenciou que apenas as descendentes fêmeas apresentaram danos cognitivos (Rayburn et al., 2001). Entretanto, existem vários estudos na literatura relacionando a melhora do desempenho cognitivo após a administração de HP em ratos. Trofimiuk et al. (2011) demonstraram que em três semanas de tratamento com HP melhora o desempenho cognitivo em ratos machos, submetidos aos testes de reconhecimento de objetos, labirintos aquático e labirinto de Barnes. Widy-Tyszkiewicz et al. (2002) também mostram que nove semanas de administração de HP diminui o tempo de latência e escape no labirinto aquático e aumentou os cruzamentos de área da plataforma, indicando um progresso no desempenho cognitivo. Além disso, Hasanein e Shahidi (2011) demonstraram que 30 dias de tratamento com HP produziu uma melhora nos parâmetros de aprendizagem, avaliados no teste de

esquiva passiva.

É importante ressaltar que a melhora nos parâmetros de aprendizagem, pelo HP, demonstrada nos estudos acima, foi observada em animais que foram submetidos a estressores, ao contrário do presente estudo, em que foram utilizados animais saudáveis para avaliar o efeito *per se* do composto. No presente estudo, TMX e HP diminuíram os níveis de BDNF no hipocampo de ratos machos e fêmeas. Conforme descrito anteriormente, o TMX e o HP são inibidores da PKC e esta desempenha um papel crucial na regulação da plasticidade sináptica e de várias formas de aquisição de memória e aprendizagem (Chu et al., 2014; Liu et al., 2014). O BDNF tem uma função essencial na sobrevivência, diferenciação e crescimento dos neurônios periféricos e centrais durante o desenvolvimento e na idade adulta. Também tem sido demonstrado que os fatores neurotróficos desempenham um papel importante na plasticidade sináptica, principalmente, no hipocampo (McAllister et al., 1999; Sohrabji e Lewis, 2006). Portanto, pode-se sugerir que o déficit na memória induzido por TMX e HP pode estar associado com a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo dos ratos. É importante enfatizar que, no presente estudo, o dano cognitivo induzido pelo TMX e pelo HP foi significativamente maior em fêmeas do que em machos. Essa diferença pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de que, tanto o tratamento TMX quanto o HP diminuíram os níveis de NGF apenas no hipocampo somente das fêmeas. Tomando em conjunto, estes dados sugerem que a PKC tem um papel mais importante para a formação de memória em fêmeas do que machos.

Também, foi demonstrado que o Li não apresentou alteração cognitiva nos testes de reconhecimento de objetos e esquiva inibitória em ratos machos e fêmeas. De acordo com os resultados deste estudo, um estudo prévio também mostrou que ratos tratados com Li durante 21 dias não apresentaram alterações na memória de reconhecimento (Perveen et al., 2013). Além disso, um estudo pré-clínico recente demonstrou que o lítio *per se* não alterou a memória de trabalho de ratos, submetidos a avaliação no teste do labirinto em Y (de Souza Gomes et al., 2015). Ota et al. (2013) também descobriram que uma única injeção de Li não mostrou alteração de parâmetros de memória aversiva na esquiva inibitória de treinos contínuos. No entanto, uma revisão recente descreveu que, em humanos, os efeitos de Li na memória são contraditórios (Vreeker et al., 2015). Um estudo clínico demonstrou que em 12 meses de uso profilático com Li houve aumento dos escores de memória imediata e tardia em pacientes com transtornos afetivos (Smigán e Perris, 1983). Um estudo piloto, avaliou os efeitos do tratamento

de longa duração com Li sobre as funções cognitivas de pacientes com TB e foi observado que não houve diferença significativa nos testes de memória após o tratamento com Li (Engelsmann et al., 1988). Juntos, estes estudos sugerem que o tratamento com Li não teve efeitos deletérios sobre a cognição.

Sabe-se que o Li induz alterações na atividade e na expressão da PKC, que conduzem a inibição desta enzima (Friedman et al., 1993; Manji e Lenox, 1994; Morishita e Watanabe, 1994). Contudo, no presente estudo, o tratamento com Li aumentou os níveis de BDNF no hipocampo de ratos machos e fêmeas. De fato, há uma série de estudos mostrando que o Li aumenta os níveis das NT (Manji et al., 2000; Frey et al., 2006a; Walz et al., 2008; Jornada et al., 2010; Cechinel-Recco et al., 2012; Varela et al., 2015). Apesar do Li inibir a PKC, está bem descrito que o fármaco ativa seletivamente o promotor IV de BDNF em neurônios primários e aumenta os níveis de BDNF no hipocampo de ratos (Frey et al., 2006a; Yasuda et al., 2009). O aumento da síntese de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo parece ser neuroprotetor/antiapoptótico, portanto, pode-se sugerir que Li exerce sua ação neurotrófica/neuroprotetora através da modulação dessas moléculas no cérebro (Hellweg et al., 2002; Angelucci et al., 2003; Frey et al., 2006a; Frey et al., 2006b). Neste estudo, o tratamento crônico com Li não induziu comprometimento cognitivo em ratos machos e fêmeas. Esse achado, pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que, embora o Li iniba a PKC, este fármaco tem ação direta na expressão de fatores neurotróficos, protegendo o cérebro contra danos cognitivos.

Os resultados deste estudo também mostraram o efeito do tratamento crônico com TMX, HP e Li no dano oxidativo em machos e fêmeas. Demonstrou-se que o TMX diminui o dano oxidativo a lipídios e a proteína no cérebro de ratas fêmeas. Os níveis de TBARS foram diminuídos no núcleo accumbens e estriado de fêmeas tratadas com TMX. Além disso, foi observado uma diminuição na geração de grupos carbonil após a administração de TMX no córtex frontal. Estudos do laboratório de neurociências demonstraram que o TMX reverteu e preveniu a hiperatividade induzida pela d-AMPH e o comportamento de risco, em um modelo animal de mania em machos, onde investigou-se o potencial antimaniaco do TMX (Moretti et al., 2011; Steckert et al., 2012), corroborando conclusões anteriores (Einat, 2007; Zarate et al., 2007).

Em uma revisão sistemática de literatura, Talaei et al. (2016), todos os ensaios clínicos randomizados, avaliaram a eficácia do TMX nos episódios de humor maníaco. Cinco ensaios clínicos randomizados 3 ensaios

adjuntos: (Kulkarni et al., 2006; Amrollahi et al., 2011; Kulkarni et al., 2014) e 2 ensaios de monoterapia: (Zarate et al., 2007; Yildiz et al., 2008) foram incluídas e demonstraram que o tratamento com TMX reduziu significativamente os sintomas maníacos em pacientes com TB. Há evidências de que o TMX é o único fármaco que atua inibindo centralmente a PKC disponível para humanos (Zarate e Manji, 2009). Portanto, este fármaco pode ser um agente antimaníaco alternativo. No entanto, é importante considerar que o TMX é também um modulador do receptor de estrogênico (efeitos estrogênicos e antiestrogênicos), o que pode contribuir para seu efeito comportamental (Sabioni et al., 2008). O gênero pode influenciar os marcadores de estresse oxidativo (Vassalle et al., 2011; Wiener et al., 2014), uma vez que o gênero pode estar associado à testosterona e aos estrogênios, o que pode afetar o dano oxidativo (Bokov et al., 2009; Numakawa et al., 2011; Jia et al., 2012; Holmes et al., 2013). Infelizmente, estudos preliminares sobre o TMX em seres humanos não foram metodologicamente projetados para distinguir a relação entre a inibição da PKC e seu efeito estrogênico (DiazGranados e Zarate, 2008).

Outro resultado importante encontrado neste estudo foi que, o tratamento com HP diminuiu significativamente os níveis de TBARS no hipocampo, no núcleo accumbens e no estriado e diminuiu os níveis de grupos carbonil no córtex frontal e estriado em fêmeas, o que pode ser explicado pelas propriedades antioxidantes da HP (Klemow et al., 2011). A atividade antioxidante da HP também foi demonstrada em vários estudos *in vitro* e *in vivo*. A HP proporciona proteção contra uma gama de danos celulares induzidos por EROs em diferentes linhas celulares (Benedi et al., 2004; Lu et al., 2004; Zou et al., 2010). O extrato também mostrou um efeito protetor nas células neuronais contra o estresse oxidativo (Jang et al., 2002; Silva et al., 2004). Diferentes extratos padronizados de HP demonstraram a eliminação de radicais livres (Benedi et al., 2004; Zheleva-Dimitrova et al., 2010) e ação antioxidante em camundongos (Singh et al., 2002; Kumar e Singh, 2007) e ratos (El-Sherbiny et al., 2003; Zou et al., 2004; Gomez del Rio et al., 2013). É possível que os efeitos antioxidantes e neuroprotetores do extrato padronizado também sejam causados pelo conteúdo de flavonóides, o HP contém até 10% de flavonóides (Rainha et al., 2011; Wolfle et al., 2014). No entanto, a hipericina contém seis grupos hidroxila (Cakir et al., 2003), que é considerada uma erva com alto nível de polifenóis (Cakir et al., 2003; Silva et al., 2005; Orcic et al., 2011). Assim, esta estrutura da molécula de hipericina é relevante para explicar a sua atividade antioxidante e os efeitos observados do HP (Benedi et al., 2004).

Vários estudos (Johnson e Pardini, 1998; Hunt et al., 2001; El-Sherbiny et al., 2003; Benedi et al., 2004; Mohanasundari et al., 2006; Kumar et al., 2010; Klemow et al., 2011) mostram que os tratamentos agudos com HP atenuaram significativamente a peroxidação lipídica, a concentração de nitrito e a glutatona reduzida foi parcialmente restaurada (GSH), bem como a atividade de CAT, sugerindo seu efeito antioxidante. Assim, em linha com os resultados do presente estudo, sugere-se que HP *per se* poderia modular os mecanismos antioxidantes, protegendo o cérebro contra danos oxidativos e um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapêuticas para o transtorno do humor e doenças mentais.

Considerando que esta diferença entre as estruturas cerebrais pode ser explicada pelo fato de que as regiões do SNC podem responder diferencialmente (Sullivan et al., 2005) e os parâmetros de estresse oxidativo foram analisados a partir de diferentes regiões cerebrais, que em parte representam diferentes tipos de células. Além disso, dentro de uma população homogênea de células, há heterogeneidade em termos de características fisiológicas e metabólicas (Sims, 1991; Sonnewald et al., 1998). Um achado interessante do presente estudo foi que o tratamento crônico com HP em ratos machos não apresentou alteração nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e de grupos carbonil em proteínas.

Neste estudo, observou-se que o efeito de Li nos parâmetros de dano oxidativo mostrou uma diminuição significativa nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em ratas, corroborando os estudos clínicos mostrando que os pacientes com TB tratados com Li mostraram uma redução significativa nos níveis de TBARS após mania (Machado-Vieira et al., 2007) e eufímico (Banerjee et al., 2012). No entanto, a pesquisa sobre o efeito do Li sobre o equilíbrio oxidante revelou resultados bastante divergentes. Alguns autores afirmam que Li pode exercer ação antioxidante (Banerjee et al., 2012; Albayrak et al., 2013; de Sousa et al., 2014) enquanto outros cientistas relataram resultados contraditórios (Oktem et al., 2005; Eskandari et al., 2012). Além disso, Nciri et al. (2008) mostraram que a ação pró-oxidante de Li pode diferir, dependendo da região estudada do cérebro. Observou-se que os efeitos do Li sob o dano oxidativo em ratos fêmeas tem sido protetor no córtex frontal e no estriado, áreas cerebrais que têm sido implicadas na fisiopatologia dos transtornos do humor. De fato, foi demonstrado que o tratamento crônico com Li aumenta acentuadamente os níveis da proteína neuroprotetora e anti-apoptótica bcl-2 no córtex frontal, hipocampo e estriado nos ratos (Chen e Chuang, 1999; Manji et al., 2000; de Vasconcellos et al., 2006), o que poderia explicar os resultados do

presente estudo. Por outro lado, observou-se que o Li induziu um aumento significativo nos níveis de grupamentos carbonil em proteínas no córtex frontal e no núcleo accumbens em ratos fêmeas. Em estudos clínicos, Andreazza et al. (2009) não encontraram diferenças significativas nos níveis de grupamentos carbonil entre o sangue de pacientes bipolares e controles saudáveis. Por outro lado, Magalhaes et al. (2012), demonstraram que os pacientes com TB apresentaram maior teor de proteína com grupamentos carbonil no soro do que os indivíduos saudáveis. Em outro estudo, esse mesmo grupo de pesquisa mostrou que os níveis de proteína com grupamentos carbonil foram aumentados nos sinaptossomas retirados do córtex frontal dos pacientes com TB (Andreazza et al., 2009), sugerindo que essa alteração pode muito bem depender do tecido avaliado. Níveis de teor de proteínas com grupamento carbonil mais elevados têm sido associados à apoptose e necrose celular, bem como, a desfechos clínicos adversos (por exemplo, câncer colorretal) (Poulse e Raju, 2014). Em um estudo pré-clínico Frey et al. (2006b) demonstraram aumento da formação de proteínas com grupamentos carbonil, induzida pela d-AMPH como parâmetros de dano oxidativo, no córtex frontal e no hipocampo. O pré-tratamento com Li preveniu parcialmente a peroxidação lipídica induzida por AMPH no hipocampo de rato, mas aumentou a peroxidação lipídica induzida por anfetamina no córtex frontal. Como no tratamento de reversão, não foram observadas alterações na formação de proteínas com grupamentos carbonil. Isto é contrário aos estudos do laboratório de neurociências (Valvassori et al., 2008; Jornada et al., 2011) que nos modelos animais de mania demonstraram um aumento dos níveis de grupos carbonila no córtex frontal e hipocampo de ratos. No entanto, no protocolo de reversão, Li reverteu o aumento induzido por oubaina (OUA) nos níveis grupamentos carbonil no hipocampo. Diferenças no desenho experimental podem explicar esta discrepância. Em contraste, o tratamento crônico com TMX, HP e Li em ratos machos não mudou nos níveis de TBARS e grupos carbonil, o que pode ser observado que estes fármacos *per se* não têm efeito de danos oxidativos. Em um estudo pré-clínico, Vina e Borras (2010) demonstraram que os ratos *Wistar* mostram uma maior produção de radicais livres pela mitocôndrias em humanos, quando comparados com fêmeas. Concomitantemente, as fêmeas têm níveis mais elevados de GSH e menos dano ao DNA mitocondrial. Nomeadamente, as fêmeas parecem ser mais resistentes ao estresse oxidativo do que os machos. Outro estudo Borras et al. (2003), investigaram o estresse oxidativo mitocondrial diferenciado entre machos e fêmeas, utilizando ratos *Wistar*.

Este estudo observou que as mitocôndrias hepáticas das fêmeas produzem aproximadamente 50% a quantidade de peróxido produzida pelos machos. Por outro lado, as ratas *Wistar* ovariectomizados produzem aproximadamente a mesma quantidade de peróxidos que os machos. É importante enfatizar, em todos os estudos pré-clínicos, citados neste artigo, foram utilizados ratos machos, não encontrou-se estudos na literatura mostrando o efeito da HP em ratos fêmeas. Portanto, este é o primeiro estudo mostrando a comparação do efeito HP entre machos e fêmeas.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que, o tratamento com inibidores da PKC – TMX e HP – induziu comprometimento nas memórias aversivas e de reconhecimento de objetos em ratos machos e fêmeas. O dano cognitivo induzido pelo TMX e pelo HP foi mais significativo em fêmeas do que em machos. Esta diferença pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de o tratamento com TMX e HP ter induzido redução nos níveis de NGF apenas no hipocampo de fêmeas. Contudo, a administração crônica do TMX e HP diminuiu os níveis de BDNF no hipocampo tanto de ratos machos como de fêmeas. Portanto, pode-se sugerir que o tratamento de longo prazo com inibidores da PKC pode levar a um comprometimento cognitivo significativo, reduzindo os níveis de fatores neurotróficos no cérebro de ratos. Além disso, também sugere-se que a PKC apresenta um papel mais importante na formação da memória em fêmeas do que em machos.

Mas, por outro lado, os resultados sugerem que o tratamento crônico com HP, em comparação com Li e TMX reduziu o dano oxidativo em regiões específicas do cérebro de ratas. É importante ressaltar, que o uso crônico de TMX e HP deve-se ter cautela quanto ao dano cognitivo, principalmente em fêmeas.

REFERÊNCIAS

- Abrial E, Etievant A, Betry C, Scarna H, Lucas G, Haddjeri N, Lambas-Senas L. Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2013;43:40-8.
- Abrial E, Lucas G, Scarna H, Haddjeri N, Lambas-Senas L. A role for the PKC signaling system in the pathophysiology and treatment of mood disorders: involvement of a functional imbalance? *Molecular neurobiology*. 2011;44(3):407-19.
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in pharmacological sciences*. 2006;27(12):639-45.
- Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current opinion in immunology*. 2007;19(5):488-96.
- Ahi J, Radulovic J, Spiess J. The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behav Brain Res*. 2004;149(1):17-31.
- Ahmad M, Elnakady Y, Farooq M, Wadaan M. Lithium induced toxicity in rats: blood serum chemistry, antioxidative enzymes in red blood cells and histopathological studies. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34(2):272-7.
- Airaksinen MS, Saarna M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature reviews Neuroscience*. 2002;3(5):383-94.
- Albayrak A, Halici Z, Polat B, Karakus E, Cadirci E, Bayir Y, Kunak S, Karcioğlu SS, Yigit S, Unal D, Atamanalp SS. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and anti-inflammatory effects in an animal model of sepsis. *Int Immunopharmacol*. 2013;16(1):35-40.
- Alfonso SI, Callender JA, Hooli B, Antal CE, Mullin K, Sherman MA, Lesne SE, Leitges M, Newton AC, Tanzi RE, Malinow R. Gain-of-function mutations in protein kinase Calpha (PKCalpha) may promote synaptic defects in Alzheimer's disease. *Sci Signal*. 2016;9(427):ra47.
- Allison JH, Blisner ME. Inhibition of the effect of lithium on brain inositol by atropine and scopolamine. *Biochemical and biophysical research communications*. 1976;68(4):1332-8.
- Amrollahi Z, Rezaei F, Salehi B, Modabbernia AH, Maroufi A, Esfandiari GR, Naderi M, Ghebleh F, Ahmadi-Abhari SA, Sadeghi M, Tabrizi M, Akhondzadeh S. Double-blind, randomized, placebo-controlled 6-week

- study on the efficacy and safety of the tamoxifen adjunctive to lithium in acute bipolar mania. *Journal of affective disorders*. 2011;129(1-3):327-31.
- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Cereser KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Goncalves CA. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *Journal of psychiatric research*. 2007;41(6):523-9.
- Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Goncalves CA, Young LT, Yatham LN. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009;34(4):263-71.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *Journal of affective disorders*. 2008;111(2-3):135-44.
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Archives of general psychiatry*. 2010;67(4):360-8.
- Angelucci F, Aloe L, Jimenez-Vasquez P, Mathe AA. Lithium treatment alters brain concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2003;6(3):225-31.
- Angst J, Gamma A, Gastpar M, Lepine JP, Mendlewicz J, Tylee A. Gender differences in depression. Epidemiological findings from the European DEPRES I and II studies. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2002;252(5):201-9.
- Apaydin EA, Maher AR, Shanman R, Booth MS, Miles JN, Sorbero ME, Hempel S. A systematic review of St. John's wort for major depressive disorder. *Systematic reviews*. 2016;5(1):148.
- Armani F, Andersen ML, Galduroz JC. Tamoxifen use for the management of mania: a review of current preclinical evidence. *Psychopharmacology*. 2014;231(4):639-49.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature neuroscience*. 1998;1(7):602-9.
- Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem*. 1992;208(3):547-57.
- Bachmann RF, Wang Y, Yuan P, Zhou R, Li X, Alesci S, Du J, Manji HK. Common effects of lithium and valproate on mitochondrial functions:

- protection against methamphetamine-induced mitochondrial damage. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2009;12(6):805-22.
- Baltuch GH, Couldwell WT, Villemure JG, Yong VW. Protein kinase C inhibitors suppress cell growth in established and low-passage glioma cell lines. A comparison between staurosporine and tamoxifen. *Neurosurgery*. 1993;33(3):495-501; discussion
- Banasr M, Duman RS. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biological psychiatry*. 2008;64(10):863-70.
- Banerjee U, Dasgupta A, Rout JK, Singh OP. Effects of lithium therapy on Na⁺-K⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2012;37(1):56-61.
- Bano S, Ara I, Saboohi K, Moattar T, Chaoudhry B. St. John's Wort increases brain serotonin synthesis by inhibiting hepatic tryptophan 2, 3 dioxygenase activity and its gene expression in stressed rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2014;27(5 Spec no):1427-35.
- Barbosa IG, Huguet RB, Neves FS, Reis HJ, Bauer ME, Janka Z, Palotas A, Teixeira AL. Impaired nerve growth factor homeostasis in patients with bipolar disorder. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. 2011a;12(3):228-32.
- Barbosa IG, Huguet RB, Sousa LP, Abreu MN, Rocha NP, Bauer ME, Carvalho LA, Teixeira AL. Circulating levels of GDNF in bipolar disorder. *Neuroscience letters*. 2011b;502(2):103-6.
- Battaini F, Mochly-Rosen D. Happy birthday protein kinase C: past, present and future of a superfamily. *Pharmacological research*. 2007;55(6):461-6.
- Baum LW. Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2005;60(6):736-43.
- Bebchuk JM, Arfken CL, Dolan-Manji S, Murphy J, Hasanat K, Manji HK. A preliminary investigation of a protein kinase C inhibitor in the treatment of acute mania. *Archives of general psychiatry*. 2000;57(1):95-7.
- Becker JB, Koob GF. Sex Differences in Animal Models: Focus on Addiction. *Pharmacological reviews*. 2016;68(2):242-63.
- Behnke K, Jensen GS, Graubbaum HJ, Gruenwald J. *Hypericum perforatum* versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression. *Advances in therapy*. 2002;19(1):43-52.

- Bejjamini V, Andreatini R. Effects of *Hypericum perforatum* and paroxetine on rat performance in the elevated T-maze. *Pharmacological research*. 2003;48(2):199-207.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF and memory formation and storage. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2008;14(2):147-56.
- Benedi J, Arroyo R, Romero C, Martin-Aragon S, Villar AM. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Life Sci*. 2004;75(10):1263-76.
- Bernabeu R, Izquierdo I, Cammarota M, Jerusalinsky D, Medina JH. Learning-specific, time-dependent increase in [3H]phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. *Brain research*. 1995;685(1-2):163-8.
- Bezchlibnyk Y, Young LT. The neurobiology of bipolar disorder: focus on signal transduction pathways and the regulation of gene expression. *Can J Psychiatry*. 2002;47(2):135-48.
- Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & development*. 2000;14(23):2919-37.
- Boele FW, Schilder CM, de Roode ML, Deijen JB, Schagen SB. Cognitive functioning during long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women with breast cancer. *Menopause (New York, NY)*. 2015;22(1):17-25.
- Bokov AF, Ko D, Richardson A. The effect of gonadectomy and estradiol on sensitivity to oxidative stress. *Endocr Res*. 2009;34(1-2):43-58.
- Bonini JS, Da Silva WC, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience*. 2007;147(1):37-45.
- Borras C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(5):546-52.
- Boudanova E, Navaroli DM, Melikian HE. Amphetamine-induced decreases in dopamine transporter surface expression are protein kinase C-independent. *Neuropharmacology*. 2008;54(3):605-12.
- Brennan AR, Yuan P, Dickstein DL, Rocher AB, Hof PR, Manji H, Arnsten AF. Protein kinase C activity is associated with prefrontal cortical decline in aging. *Neurobiology of aging*. 2009;30(5):782-92.

- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. Progesterone receptors: form and function in brain. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2008;29(2):313-39.
- Briskin DP, Leroy A, Gawienowski M. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000;38(5):413-20.
- Brunello N. Mood stabilizers: protecting the mood...protecting the brain. *Journal of affective disorders*. 2004;79 Suppl 1:S15-20.
- Brunello N, Tascedda F. Cellular mechanisms and second messengers: relevance to the psychopharmacology of bipolar disorders. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2003;6(2):181-9.
- Burchuladze R, Potter J, Rose SP. Memory formation in the chick depends on membrane-bound protein kinase C. *Brain research*. 1990;535(1):131-8.
- Butterweck V, Wall A, Lieflander-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*. 1997;30 Suppl 2:117-24.
- Cade JF. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust*. 1949;2(10):349-52.
- Cahill L. Why sex matters for neuroscience. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(6):477-84.
- Cakir A, Mavi A, Yildirim A, Duru ME, Harmandar M, Kazaz C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *J Ethnopharmacol*. 2003;87(1):73-83.
- Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Infrerera G, Squadrito F, Parisi A, De Sarro G, Caputi A. Serotonin, norepinephrine and dopamine involvement in the antidepressant action of *hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry*. 2001;34(2):45-9.
- Cammarota M, Paratcha G, Levi de Stein M, Bernabeu R, Izquierdo I, Medina JH. B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochemical research*. 1997;22(4):499-505.
- Casebolt TL, Jope RS. Long-term lithium treatment selectively reduces receptor-coupled inositol phospholipid hydrolysis in rat brain. *Biol Psychiatry*. 1989;25(3):329-40.
- Cechinel-Recco K, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Arent CO, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J. Lithium and tamoxifen

- modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. *J Psychopharmacol.* 2012;26(12):1594-604.
- Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci.* 1998;63(6):499-510.
- Chen R, Furman CA, Zhang M, Kim MN, Gereau RWt, Leitges M, Gnegy ME. Protein kinase C β is a critical regulator of dopamine transporter trafficking and regulates the behavioral response to amphetamine in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328(3):912-20.
- Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem.* 1999;274(10):6039-42.
- Chen X, Li J, Chen J, Li D, Ye R, Zhang J, Zhu C, Tian Y, Wang K. Decision-making impairments in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Hormones and behavior.* 2014;66(2):449-56.
- Chen XW, Serag ES, Sneed KB, Liang J, Chew H, Pan SY, Zhou SF. Clinical herbal interactions with conventional drugs: from molecules to maladies. *Current medicinal chemistry.* 2011;18(31):4836-50.
- Chu Y, Fioravante D, Leitges M, Regehr WG. Calcium-dependent PKC isoforms have specialized roles in short-term synaptic plasticity. *Neuron.* 2014;82(4):859-71.
- Cirulli F, Alleva E. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Frontiers in neuroendocrinology.* 2009;30(3):379-95.
- Coezy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer research.* 1982;42(1):317-23.
- Comim CM, Barichello T, Grandgirard D, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Leib SL. Caspase-3 mediates in part hippocampal apoptosis in sepsis. *Molecular neurobiology.* 2013;47(1):394-8.
- Contestabile A, Greco B, Ghezzi D, Tucci V, Benfenati F, Gasparini L. Lithium rescues synaptic plasticity and memory in Down syndrome mice. *The Journal of clinical investigation.* 2013;123(1):348-61.
- Cosentino-Gomes D, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *International journal of molecular sciences.* 2012;13(9):10697-721.
- Cosgrove KP, Mazure CM, Staley JK. Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biological psychiatry.* 2007;62(8):847-55.

- Coyle JT, Duman RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron*. 2003;38(2):157-60.
- Crupi R, Mazzon E, Marino A, La Spada G, Bramanti P, Battaglia F, Cuzzocrea S, Spina E. *Hypericum perforatum* treatment: effect on behaviour and neurogenesis in a chronic stress model in mice. *BMC complementary and alternative medicine*. 2011;11:7.
- Cunha MP, Budni J, Pazini FL, Oliveira A, Rosa JM, Lopes MW, Leal RB, Rodrigues AL. Involvement of PKA, PKC, CAMK-II and MEK1/2 in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. *Pharmacological reports* : PR. 2014;66(4):653-9.
- Curtis JD, Lersten NR. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. *New Phytologist*. 1990;114(4):571-80.
- Dai S, Hall DD, Hell JW. Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiological reviews*. 2009;89(2):411-52.
- Daniel JM, Fader AJ, Spencer AL, Dohanich GP. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Hormones and behavior*. 1997;32(3):217-25.
- Das J, Rahman GM. C1 domains: structure and ligand-binding properties. *Chem Rev*. 2014;114(24):12108-31.
- Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis SR, Delmestri A, Forbes JF, Haddad P, Hou MF, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan WH, Mathew BS, Mittra I, Muller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzella L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach MT, Tort S, Urrutia G, Valentini M, Wang Y, Peto R. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* (London, England). 2013;381(9869):805-16.
- de Barry J, Liegeois CM, Janoshazi A. Protein kinase C as a peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2010;45(1):64-9.
- De Berardis D, Brucchi M, Serroni N, Valchera A, Fornaro M, Mazza M, Martinotti G, Di Giannantonio M. Successful use of agomelatine in the treatment of major depression in a woman taking tamoxifen: a case report. *Clin Neuropharmacol*. 2014;37(1):31-3.
- de Oliveira GS, Cereser KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, Aguiar B, Pfaffenseller B, Kapczinski F. Decreased brain-derived

neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *Journal of psychiatric research*. 2009;43(14):1171-4.

de Sousa RT, Zarate CA, Jr., Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, Machado-Vieira R. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. *Journal of psychiatric research*. 2014;50:36-41.

de Souza Gomes JA, de Souza GC, Berk M, Cavalcante LM, de Sousa FC, Budni J, de Lucena DF, Quevedo J, Carvalho AF, Macedo D. Antimanic-like activity of candesartan in mice: Possible involvement of antioxidant, anti-inflammatory and neurotrophic mechanisms. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2015;25(11):2086-97.

de Vasconcellos AP, Nieto FB, Crema LM, Diehl LA, de Almeida LM, Prediger ME, da Rocha ER, Dalmaz C. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochemical research*. 2006;31(9):1141-51.

DeChristopher BA, Loy BA, Marsden MD, Schrier AJ, Zack JA, Wender PA. Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs in vitro. *Nat Chem*. 2012;4(9):705-10.

Demarest TG, McCarthy MM. Sex differences in mitochondrial (dys)function: Implications for neuroprotection. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2015;47(1-2):173-88.

Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E, Izzo AA. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends in pharmacological sciences*. 2001;22(6):292-7.

Dias VV, Brissos S, Frey BN, Andreazza AC, Cardoso C, Kapczinski F. Cognitive function and serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorder. *Bipolar disorders*. 2009;11(6):663-71.

DiazGranados N, Zarate CA, Jr. A review of the preclinical and clinical evidence for protein kinase C as a target for drug development for bipolar disorder. *Current psychiatry reports*. 2008;10(6):510-9.

Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11(2):240-9.

Dries DR, Gallegos LL, Newton AC. A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. *J Biol Chem*. 2007;282(2):826-30.

Einat H. Different behaviors and different strains: potential new ways to model bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31(6):850-7.

- Einat H, Manji HK. Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. *Biological psychiatry*. 2006;59(12):1160-71.
- Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, Manji HK. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2007;55(3-4):123-31.
- El-Sherbiny DA, Khalifa AE, Attia AS, Eldenshary Eel D. Hypericum perforatum extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;76(3-4):525-33.
- Emamghoreishi M, Keshavarz M, Nekooeian AA. Acute and chronic effects of lithium on BDNF and GDNF mRNA and protein levels in rat primary neuronal, astroglial and neuroastroglia cultures. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2015;18(3):240-6.
- Engelsmann F, Katz J, Ghadirian AM, Schachter D. Lithium and memory: a long-term follow-up study. *Journal of clinical psychopharmacology*. 1988;8(3):207-12.
- Engler-Chiurazzi EB, Singh M, Simpkins JW. From the 90's to now: A brief historical perspective on more than two decades of estrogen neuroprotection. *Brain Research*. 2016;1633:96-100.
- Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988;31(1):47-59.
- Eskandari MR, Fard JK, Hosseini MJ, Pourahmad J. Glutathione mediated reductive activation and mitochondrial dysfunction play key roles in lithium induced oxidative stress and cytotoxicity in liver. *Biometals*. 2012;25(5):863-73.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*. 1990;186:407-21.
- Fernandes BS, Berk M, Turck CW, Steiner J, Goncalves CA. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis. *Molecular psychiatry*. 2014;19(7):750-1.
- Fernandes BS, Gama CS, Cereser KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, de Lucena D, Kunz M, Gomes FA, Kapczinski F. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *Journal of psychiatric research*. 2011;45(8):995-1004.

File SE. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods*. 1980;2(3):219-38.

Flausino OA, Jr., Zangrossi H, Jr., Salgado JV, Viana MB. Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(1-2):251-7.

Francis AJ. Antidepressant action of St. John's Wort, *Hypericum perforatum*: a test of the circadian hypotheses. *Phytomedicine*. 2005;12(3):167-72.

Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*. 2006a;79(3):281-6.

Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2006b;31(5):326-32.

Friedman E, Hoau Yan W, Levinson D, Connell TA, Singh H. Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biological psychiatry*. 1993;33(7):520-5.

Fries GR, Pfaffenseller B, Stertz L, Paz AV, Dargel AA, Kunz M, Kapczinski F. Staging and neuroprogression in bipolar disorder. *Current psychiatry reports*. 2012;14(6):667-75.

Galea LA, Wainwright SR, Roes MM, Duarte-Guterman P, Chow C, Hamson DK. Sex, hormones and neurogenesis in the hippocampus: hormonal modulation of neurogenesis and potential functional implications. *Journal of neuroendocrinology*. 2013;25(11):1039-61.

Galecki P, Szmraj J, Bienkiewicz M, Florkowski A, Galecka E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacological reports* : PR. 2009;61(3):436-47.

Galeotti N, Farzad M, Bianchi E, Ghelardini C. PKC-mediated potentiation of morphine analgesia by St. John's Wort in rodents and humans. *J Pharmacol Sci*. 2014;124(4):409-17.

Gama CS, Kunz M, Magalhaes PV, Kapczinski F. Staging and neuroprogression in bipolar disorder: a systematic review of the literature. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*. 2013;35(1):70-4.

- Gambarana C, Ghiglieri O, Tolu P, De Montis MG, Giachetti D, Bombardelli E, Tagliamonte A. Efficacy of an *Hypericum perforatum* (St. John's wort) extract in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21(2):247-57.
- Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Archives of general psychiatry*. 1998;55(9):809-15.
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2009;33(3):450-5.
- Gawryluk JW, Wang JF, Andreadza AC, Shao L, Young LT. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2011;14(1):123-30.
- Geddes JR, Goodwin GM, Rendell J, Azorin JM, Cipriani A, Ostacher MJ, Morriss R, Alder N, Juszczak E. Lithium plus valproate combination therapy versus monotherapy for relapse prevention in bipolar I disorder (BALANCE): a randomised open-label trial. *Lancet*. 2010;375(9712):385-95.
- Gergerlioglu HS, Savas HA, Bulbul F, Selek S, Uz E, Yumru M. Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2007;31(3):697-702.
- Gerlai R, McNamara A, Choi-Lundberg DL, Armanini M, Ross J, Powell-Braxton L, Phillips HS. Impaired water maze learning performance without altered dopaminergic function in mice heterozygous for the GDNF mutation. *The European journal of neuroscience*. 2001;14(7):1153-63.
- Gibbs RB, Johnson DA. Sex-specific effects of gonadectomy and hormone treatment on acquisition of a 12-arm radial maze task by Sprague Dawley rats. *Endocrinology*. 2008;149(6):3176-83.
- Giorgione JR, Lin JH, McCammon JA, Newton AC. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *J Biol Chem*. 2006;281(3):1660-9.
- Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem*. 1966;13(8):655-69.

Gobbi M, Mennini T. Is St John's wort a 'Prozac-like' herbal antidepressant? Trends in pharmacological sciences. 2001;22(11):557-9; author reply 9.

Gobbi M, Valle FD, Ciapparelli C, Diomede L, Morazzoni P, Verotta L, Caccia S, Cervo L, Mennini T. Hypericum perforatum L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 1999;360(3):262-9.

Goichberg P, Kalinkovich A, Borodovsky N, Tesio M, Petit I, Nagler A, Hardan I, Lapidot T. cAMP-induced PKC ζ activation increases functional CXCR4 expression on human CD34+ hematopoietic progenitors. Blood. 2006;107(3):870-9.

Gold PE. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. Behav Neural Biol. 1986;46(1):87-98.

Golski S, Olds JL, Mishkin M, Olton DS, Alkon DL. Protein kinase C in the hippocampus is altered by spatial but not cued discriminations: a component task analysis. Brain research. 1995;676(1):53-62.

Gomez del Rio MA, Sanchez-Reus MI, Iglesias I, Pozo MA, Garcia-Arencibia M, Fernandez-Ruiz J, Garcia-Garcia L, Delgado M, Benedi J. Neuroprotective Properties of Standardized Extracts of Hypericum perforatum on Rotenone Model of Parkinson's Disease. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013;12(5):665-79.

Gopalakrishna R, McNeill TH, Elhiani AA, Gundimeda U. Methods for studying oxidative regulation of protein kinase C. Methods in enzymology. 2013;528:79-98.

Gould TD, Einat H, Bhat R, Manji HK. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. The international journal of neuropsychopharmacology. 2004;7(4):387-90.

Gould TD, Manji HK. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. J Psychosom Res. 2002;53(2):687-97.

Grande I, Fries GR, Kunz M, Kapczinski F. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. Psychiatry investigation. 2010;7(4):243-50.

Greil W. [Pharmacokinetics and toxicology of lithium]. Bibliotheca psychiatrica. 1981(161):69-103.

Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nat Rev Cancer. 2007;7(4):281-94.

Gutierrez-Lobos K, Scherer M, Anderer P, Katschnig H. The influence of age on the female/male ratio of treated incidence rates in depression. BMC psychiatry. 2002;2:3.

- Hahn CG, Umapathy, Wang HY, Koneru R, Levinson DF, Friedman E. Lithium and valproic acid treatments reduce PKC activation and receptor-G protein coupling in platelets of bipolar manic patients. *Journal of psychiatric research*. 2005;39(4):355-63.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006;97(6):1634-58.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 5):1147-50.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends in pharmacological sciences*. 2011;32(3):125-30.
- Halliwell B, Lee CY. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;13(2):145-56.
- Hammond R, Mauk R, Ninaci D, Nelson D, Gibbs RB. Chronic treatment with estrogen receptor agonists restores acquisition of a spatial learning task in young ovariectomized rats. *Hormones and behavior*. 2009;56(3):309-14.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1984;327(1):1-5.
- Hasanein P, Shahidi S. Effects of Hypericum perforatum extract on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Phytotherapy research : PTR*. 2011;25(4):544-9.
- Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology*. 2002;43(7):1173-9.
- Hata T, Itoh E, Nishikawa H. Behavioral characteristics of SART-stressed mice in the forced swim test and drug action. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;51(4):849-53.
- Hellweg R, Lang UE, Nagel M, Baumgartner A. Subchronic treatment with lithium increases nerve growth factor content in distinct brain regions of adult rats. *Molecular psychiatry*. 2002;7(6):604-8.
- Hennessy M, Kelleher D, Spiers JP, Barry M, Kavanagh P, Back D, Mulcahy F, Feely J. St Johns wort increases expression of P-glycoprotein: implications for drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53(1):75-82.
- Herken H, Gurel A, Selek S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, Kap O, Yumru M, Savas HA, Akyol O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major

depression: impact of antidepressant treatment. *Archives of medical research*. 2007;38(2):247-52.

Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40305-16.

Hoertel N, de Maricourt P, Gorwood P. Novel routes to bipolar disorder drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2013;8(8):907-18.

Hofrichter J, Krohn M, Schumacher T, Lange C, Feistel B, Walbroel B, Heinze HJ, Crockett S, Sharbel TF, Pahnke J. Reduced Alzheimer's disease pathology by St. John's Wort treatment is independent of hyperforin and facilitated by ABCC1 and microglia activation in mice. *Current Alzheimer research*. 2013;10(10):1057-69.

Hogan CS, Freeman MP. Adverse Effects in the Pharmacologic Management of Bipolar Disorder During Pregnancy. *The Psychiatric clinics of North America*. 2016;39(3):465-75.

Holmes S, Abbassi B, Su C, Singh M, Cunningham RL. Oxidative stress defines the neuroprotective or neurotoxic properties of androgens in immortalized female rat dopaminergic neuronal cells. *Endocrinology*. 2013;154(11):4281-92.

Hongpaisan J, Alkon DL. A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19571-6.

Horgan K, Cooke E, Hallett MB, Mansel RE. Inhibition of protein kinase C mediated signal transduction by tamoxifen. Importance for antitumour activity. *Biochem Pharmacol*. 1986;35(24):4463-5.

Hrabetova S, Sacktor TC. Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(17):5324-33.

Hunt EJ, Lester CE, Lester EA, Tackett RL. Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sci*. 2001;69(2):181-90.

Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem*. 1977;252(21):7610-6.

- Irie K, Nakagawa Y, Ohigashi H. Toward the development of new medicinal leads with selectivity for protein kinase C isozymes. *Chem Rec.* 2005;5(4):185-95.
- Irie K, Yanagita RC, Nakagawa Y. Challenges to the development of bryostatin-type anticancer drugs based on the activation mechanism of protein kinase Cdelta. *Med Res Rev.* 2012;32(3):518-35.
- Irvine K, Laws KR, Gale TM, Kondel TK. Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. *Journal of clinical and experimental neuropsychology.* 2012;34(9):989-98.
- Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* 2006;29(9):496-505.
- Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. *Physiological reviews.* 2016;96(2):695-750.
- Izquierdo I, Medina JH. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends in pharmacological sciences.* 1991;12(7):260-5.
- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory.* 1997;68(3):285-316.
- Jackson A, D'Avolio A, Moyle G, Bonora S, Di Perri G, Else L, Simiele M, Singh GJ, Back D, Boffito M. Pharmacokinetics of the co-administration of boceprevir and St John's wort to male and female healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(7):1911-5.
- Jang MH, Lee TH, Shin MC, Bahn GH, Kim JW, Shin DH, Kim EH, Kim CJ. Protective effect of *Hypericum perforatum* Linn (St. John's wort) against hydrogen peroxide-induced apoptosis on human neuroblastoma cells. *Neuroscience letters.* 2002;329(2):177-80.
- Jensen JB, Mork A. Altered protein phosphorylation in the rat brain following chronic lithium and carbamazepine treatments. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology.* 1997;7(3):173-9.
- Jia J, Wu YH, Zhou XQ, Wang Y. Effects of testosterone propionate on oxidative stress and the expression of spleen cytokine genes in endosulfan-treated mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2012;31(1):17-26.
- Johnson SA, Pardini RS. Antioxidant enzyme response to hypericin in EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(5):817-26.

- Joep RS. A bimodal model of the mechanism of action of lithium. *Molecular psychiatry*. 1999;4(1):21-5.
- Joep RS. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:16.
- Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *Journal of psychiatric research*. 2010;44(8):506-10.
- Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina F, Ferreira CL, Arent CO, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *Journal of psychiatric research*. 2011;45(2):162-8.
- Kapczinski F, Frey BN, Zannatto V. [Physiopathology of bipolar disorders: what have changed in the last 10 years?]. *Revista brasileira de psiquiatria* (Sao Paulo, Brazil : 1999). 2004;26 Suppl 3:17-21.
- Kasote DM, Hegde MV, Katyare SS. Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy. *BioFactors* (Oxford, England). 2013;39(4):392-406.
- Kasper S, Caraci F, Forti B, Drago F, Aguglia E. Efficacy and tolerability of Hypericum extract for the treatment of mild to moderate depression. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2010;20(11):747-65.
- Kessing LV, Andersen PK. The effect of episodes on recurrence in affective disorder: a case register study. *Journal of affective disorders*. 1999;53(3):225-31.
- Kitamura Y, Araki H, Gomita Y. Influence of ACTH on the effects of imipramine, desipramine and lithium on duration of immobility of rats in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(1-2):63-9.
- Kitanov GM. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical systematics and ecology*. 2001;29(2):171-8.
- Klemow KM, Bartlow A, Crawford J, Kocher N, Shah J, Ritsick M. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Llc.; 2011.
- Kocanova S, Hornakova T, Hritz J, Jancura D, Chorvat D, Mateasik A, Ulicny J, Refregiers M, Maurizot JC, Miskovsky P. Characterization of the

interaction of hypericin with protein kinase C in U-87 MG human glioma cells. *Photochemistry and photobiology*. 2006;82(3):720-8.

Kraus B, Wolff H, Elstner EF, Heilmann J. Hyperforin is a modulator of inducible nitric oxide synthase and phagocytosis in microglia and macrophages. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2010;381(6):541-53.

Kubin A, Wierrani F, Burner U, Alth G, Grunberger W. Hypericin--the facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des*. 2005;11(2):233-53.

Kulkarni J, Berk M, Wang W, Mu L, Scarr E, Van Rheen TE, Worsley R, Gurvich C, Gavrilidis E, de Castella A, Fitzgerald P, Davis SR. A four week randomised control trial of adjunctive medroxyprogesterone and tamoxifen in women with mania. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;43:52-61.

Kulkarni J, Garland KA, Scaffidi A, Headey B, Anderson R, de Castella A, Fitzgerald P, Davis SR. A pilot study of hormone modulation as a new treatment for mania in women with bipolar affective disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31(4):543-7.

Kulkarni SK, Akula KK, Deshpande J. Evaluation of antidepressant-like activity of novel water-soluble curcumin formulations and St. John's wort in behavioral paradigms of despair. *Pharmacology*. 2012;89(1-2):83-90.

Kumar A, Garg R, Prakash AK. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) treatment on restraint stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. *BMC complementary and alternative medicine*. 2010;10:18.

Kumar A, Singh A. Protective effect of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) extract on 72-hour sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and oxidative damage in mice. *Planta Med*. 2007;73(13):1358-64.

Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Cereser KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2008;32(7):1677-81.

Lee KC, Ray GT, Hunkeler EM, Finley PR. Tamoxifen treatment and new-onset depression in breast cancer patients. *Psychosomatics*. 2007;48(3):205-10.

Lenox RH, Hahn CG. Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 9:5-15.

- Lenox RH, Watson DG, Patel J, Ellis J. Chronic lithium administration alters a prominent PKC substrate in rat hippocampus. *Brain Res.* 1992;570(1-2):333-40.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiological reviews.* 1968;48(3):534-69.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of experimental zoology.* 1951;116(2):321-61.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology.* 1990;186:464-78.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology.* 1994;233:346-57.
- Li X, Jope RS. Selective inhibition of the expression of signal transduction proteins by lithium in nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *J Neurochem.* 1995;65(6):2500-8.
- Lim CS, Alkon DL. Protein kinase C stimulates HuD-mediated mRNA stability and protein expression of neurotrophic factors and enhances dendritic maturation of hippocampal neurons in culture. *Hippocampus.* 2012;22(12):2303-19.
- Liu B, Feng J, Wang JH. Protein kinase C is essential for kainate-induced anxiety-related behavior and glutamatergic synapse upregulation in prelimbic cortex. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20(11):982-90.
- Liu F, Day M, Muniz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nature neuroscience.* 2008;11(3):334-43.
- Liu RJ, Fuchikami M, Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS, Aghajanian GK. GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(11):2268-77.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Loy BA, Lesser AB, Staveness D, Billingsley KL, Cegelski L, Wender PA. Toward a biorelevant structure of protein kinase C bound modulators: design, synthesis, and evaluation of labeled bryostatin analogues for

- analysis with rotational echo double resonance NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2015;137(10):3678-85.
- Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of experimental pharmacology.* 2014;220:223-50.
- Lu YH, Du CB, Liu JW, Hong W, Wei DZ. Neuroprotective effects of *Hypericum perforatum* on trauma induced by hydrogen peroxide in PC12 cells. *Am J Chin Med.* 2004;32(3):397-405.
- Luca A, Calandra C, Luca M. Gsk3 Signalling and Redox Status in Bipolar Disorder: Evidence from Lithium Efficacy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3030547.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V, Jr., da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, Gentil V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neuroscience letters.* 2007;421(1):33-6.
- Machado-Vieira R, Ibrahim L, Zarate CA, Jr. Histone deacetylases and mood disorders: epigenetic programming in gene-environment interactions. *CNS Neurosci Ther.* 2011;17(6):699-704.
- Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA, Jr. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar disorders.* 2009;11 Suppl 2:92-109.
- Machado-Vieira R, Salvatore G, DiazGranados N, Ibrahim L, Latov D, Wheeler-Castillo C, Baumann J, Henter ID, Zarate CA, Jr. New therapeutic targets for mood disorders. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:713-26.
- Machado-Vieira R, Soeiro-De-Souza MG, Richards EM, Teixeira AL, Zarate CA, Jr. Multiple levels of impaired neural plasticity and cellular resilience in bipolar disorder: developing treatments using an integrated translational approach. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry.* 2014;15(2):84-95.
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry.* 2011;35(3):676-92.
- Magalhaes PV, Jansen K, Pinheiro RT, Colpo GD, da Motta LL, Klamt F, da Silva RA, Kapczinski F. Peripheral oxidative damage in early-stage mood disorders: a nested population-based case-control study. *The international journal of neuropsychopharmacology.* 2012;15(8):1043-50.

Malhi GS, Tanious M, Das P, Coulston CM, Berk M. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. Current understanding. *CNS drugs*. 2013;27(2):135-53.

Manji HK, Bersudsky Y, Chen G, Belmaker RH, Potter WZ. Modulation of protein kinase C isozymes and substrates by lithium: the role of myo-inositol. *Neuropsychopharmacology*. 1996;15(4):370-81.

Manji HK, Duman RS. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacology bulletin*. 2001;35(2):5-49.

Manji HK, Etcheberrigaray R, Chen G, Olds JL. Lithium decreases membrane-associated protein kinase C in hippocampus: selectivity for the alpha isozyme. *J Neurochem*. 1993;61(6):2303-10.

Manji HK, Lenox RH. Long-term action of lithium: a role for transcriptional and posttranscriptional factors regulated by protein kinase C. *Synapse (New York, NY)*. 1994;16(1):11-28.

Manji HK, Lenox RH. Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biological psychiatry*. 1999;46(10):1328-51.

Manji HK, Lenox RH. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biological psychiatry*. 2000;48(6):518-30.

Manji HK, Moore GJ, Chen G. Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 9:82-96.

Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, Payne JL, Denicoff K, N AG, Zarate CA, Jr., Charney DS. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biological psychiatry*. 2003;53(8):707-42.

Mann CD, Vu TB, Hrdina PD. Protein kinase C in rat brain cortex and hippocampus: effect of repeated administration of fluoxetine and desipramine. *Br J Pharmacol*. 1995;115(4):595-600.

Manosso LM, Moretti M, Ribeiro CM, Goncalves FM, Leal RB, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015;59:59-67.

Martinez-Aran A, Vieta E, Reinares M, Colom F, Torrent C, Sanchez-Moreno J, Benabarre A, Goikolea JM, Comes M, Salamero M. Cognitive

- function across manic or hypomanic, depressed, and euthymic states in bipolar disorder. *The American journal of psychiatry*. 2004;161(2):262-70.
- Martinez-Aran A, Vieta E, Torrent C, Sanchez-Moreno J, Goikolea JM, Salamero M, Malhi GS, Gonzalez-Pinto A, Daban C, Alvarez-Grandi S, Fountoulakis K, Kaprinis G, Tabares-Seisdedos R, Ayuso-Mateos JL. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar disorders*. 2007;9(1-2):103-13.
- Mathews R, Li PP, Young LT, Kish SJ, Warsh JJ. Increased G alpha q/11 immunoreactivity in postmortem occipital cortex from patients with bipolar affective disorder. *Biological psychiatry*. 1997;41(6):649-56.
- Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *The Journal of nutrition*. 2003;133 Suppl 3:933s-40s.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*. 1999;22:295-318.
- McCarthy MM. Multifaceted origins of sex differences in the brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2016;371(1688):20150106.
- McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behavioral neuroscience*. 2012;126(1):4-16.
- McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):279-307.
- Melikian HE. Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacol Ther*. 2004;104(1):17-27.
- Mennini T, Gobbi M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci*. 2004;75(9):1021-7.
- Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(12):850-60.
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(12):937-57.
- Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *Faseb j*. 1998;12(1):35-42.
- Mohanasundari M, Srinivasan MS, Sethupathy S, Sabesan M. Enhanced neuroprotective effect by combination of bromocriptine and *Hypericum perforatum* extract against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurol Sci*. 2006;249(2):140-4.
- Moretti M, Valvassori SS, Steckert AV, Rochi N, Benedet J, Scaini G, Kapczinski F, Streck EL, Zugno AI, Quevedo J. Tamoxifen effects on

- respiratory chain complexes and creatine kinase activities in an animal model of mania. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;98(2):304-10.
- Morishita S, Watanabe S. The direct effect of lithium and carbamazepine on protein kinase C in rat brain. *The Japanese journal of psychiatry and neurology.* 1994;48(1):123-6.
- Muller WE, Rolli M, Schafer C, Hafner U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry.* 1997;30 Suppl 2:102-7.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology.* 2001;63(1):71-124.
- Musashi M, Ota S, Shiroshita N. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol.* 2000;72(1):12-9.
- Nadeem RI, Ahmed HI, El-Denshary EE. Effect of Imipramine, Paroxetine, and Lithium Carbonate on Neurobehavioral Changes of Streptozotocin in Rats: Impact on Glycogen Synthase Kinase-3 and Blood Glucose Level. *Neurochemical research.* 2015;40(9):1810-8.
- Nciri R, Allagui MS, Croute F, Vincent C, Elfeki A. [Effects of low doses of Li carbonate injected into mice. Functional changes in kidney seem to be related to the oxidative status]. *C R Biol.* 2008;331(1):23-31.
- Nelson TJ, Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *European journal of pharmacology.* 2008;585(1):76-87.
- Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev.* 2001;101(8):2353-64.
- Newton AC. Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(3):E395-402.
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiological reviews.* 2000;80(1):315-60.
- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science (New York, NY).* 1992;258(5082):607-14.
- Nishizuka Y. Discovery and prospect of protein kinase C research: epilogue. *J Biochem.* 2003;133(2):155-8.
- Nissen-Meyer LS, Chaudhry FA. Protein Kinase C Phosphorylates the System N Glutamine Transporter SN1 (Slc38a3) and Regulates Its Membrane Trafficking and Degradation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:138.

- Nogues X. Protein kinase C, learning and memory: a circular determinism between physiology and behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1997;21(3):507-29.
- Nogues X, Micheau J, Jaffard R. Protein kinase C activity in the hippocampus following spatial learning tasks in mice. *Hippocampus*. 1994;4(1):71-7.
- Numakawa T, Matsumoto T, Numakawa Y, Richards M, Yamawaki S, Kunugi H. Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration. *J Toxicol*. 2011;2011:405194.
- O'Brian CA, Housey GM, Weinstein IB. Specific and direct binding of protein kinase C to an immobilized tamoxifen analogue. *Cancer research*. 1988;48(13):3626-9.
- Ohno S, Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J Biochem*. 2002;132(4):509-11.
- Oktem F, Ozguner F, Sulak O, Olgar S, Akturk O, Yilmaz HR, Altuntas I. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem*. 2005;277(1-2):109-15.
- Orcic DZ, Mimica-Dukic NM, Franciskovic MM, Petrovic SS, Jovin ED. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chem Cent J*. 2011;5:34.
- Oruch R, Elderbi MA, Khattab HA, Pryme IF, Lund A. Lithium: a review of pharmacology, clinical uses, and toxicity. *European journal of pharmacology*. 2014;740:464-73.
- Oster H, Eichele G, Leitges M. Differential expression of atypical PKCs in the adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;127(1-2):79-88.
- Ota SM, Moreira KD, Suchecki D, Oliveira MG, Tiba PA. Lithium prevents REM sleep deprivation-induced impairments on memory consolidation. *Sleep*. 2013;36(11):1677-84.
- Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *International clinical psychopharmacology*. 2004;19(2):89-95.
- Ozturk Y. Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. *Pharmacopsychiatry*. 1997;30 Suppl 2:125-8.
- Palmer JL, Trotter T, Joy AA, Carlson LE. Cognitive effects of Tamoxifen in pre-menopausal women with breast cancer compared to healthy controls. *Journal of cancer survivorship : research and practice*. 2008;2(4):275-82.
- Palumbo ML, Zorrilla Zubilete MA, Cremaschi GA, Genaro AM. Different effect of chronic stress on learning and memory in BALB/c and C57BL/6

inbred mice: Involvement of hippocampal NO production and PKC activity. *Stress*. 2009;12(4):350-61.

Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Conley RR. Decreased catalytic activity and expression of protein kinase C isozymes in teenage suicide victims: a postmortem brain study. *Archives of general psychiatry*. 2004;61(7):685-93.

Pandey GN, Ren X, Dwivedi Y, Pavuluri MN. Decreased protein kinase C (PKC) in platelets of pediatric bipolar patients: effect of treatment with mood stabilizing drugs. *Journal of psychiatric research*. 2008;42(2):106-16.

Panocka I, Perfumi M, Angeletti S, Ciccocioppo R, Massi M. Effects of *Hypericum perforatum* extract on ethanol intake, and on behavioral despair: a search for the neurochemical systems involved. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;66(1):105-11.

Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*. 2001;32(1):123-40.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14(3):149-67.

Perloff MD, von Moltke LL, Stormer E, Shader RI, Greenblatt DJ. Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure. *Br J Pharmacol*. 2001;134(8):1601-8.

Perveen T, Haider S, Mumtaz W, Razi F, Tabassum S, Haleem DJ. Attenuation of stress-induced behavioral deficits by lithium administration via serotonin metabolism. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(2):336-42.

Petit I, Goichberg P, Spiegel A, Peled A, Brodie C, Seger R, Nagler A, Alon R, Lapidot T. Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(1):168-76.

Pezzato FA, Can A, Hoshino K, Horta Jde A, Jr., Mijares MG, Gould TD. Effect of lithium on behavioral disinhibition induced by electrolytic lesion of the median raphe nucleus. *Psychopharmacology*. 2015;232(8):1441-50.

Pfaffenseller B, Fries GR, Wollenhaupt-Aguiar B, Colpo GD, Stertz L, Panizzutti B, Magalhaes PV, Kapczinski F. Neurotrophins, inflammation and oxidative stress as illness activity biomarkers in bipolar disorder. *Expert review of neurotherapeutics*. 2013;13(7):827-42.

- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977;266(5604):730-2.
- Post RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *Journal of psychiatric research*. 2007;41(12):979-90.
- Poulose N, Raju R. Aging and injury: alterations in cellular energetics and organ function. *Aging Dis*. 2014;5(2):101-8.
- Powell CM, Johnston D, Sweatt JD. Autonomously active protein kinase C in the maintenance phase of N-methyl-D-aspartate receptor-independent long term potentiation. *J Biol Chem*. 1994;269(45):27958-63.
- Price AL, Marzani-Nissen GR. Bipolar disorders: a review. *American family physician*. 2012;85(5):483-93.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003;463(1-3):3-33.
- Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate CA, Jr., Manji HK. Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology*. 2010;62(1):50-60.
- Rainha N, Lima E, Baptista J. Comparison of the endemic Azorean *Hypericum foliosum* with other *Hypericum* species: antioxidant activity and phenolic profile. *Nat Prod Res*. 2011;25(2):123-35.
- Rayburn WF, Gonzalez CL, Christensen HD, Harkins TL, Kupiec TC. Impact of hypericum (St.-John's-wort) given prenatally on cognition of mice offspring. *Neurotoxicology and teratology*. 2001;23(6):629-37.
- Reis EM, Ropke J, Busanello A, Reckziegel P, Leal CQ, Wagner C, Boligon AA, Athayde ML, Fachineto R. Effect of *Hypericum perforatum* on different models of movement disorders in rats. *Behav Pharmacol*. 2013;24(7):623-7.
- Réus G. Efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração de cetamina e memantina em ratos wistar: implicações para o envolvimento dos sistema glutamatérgico no tratamento da depressão. Biblioteca UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC; 2011.
- Reyland ME. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2386-99.
- Reymann KG, Frey U, Jork R, Matthies H. Polymyxin B, an inhibitor of protein kinase C, prevents the maintenance of synaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Brain research*. 1988;440(2):305-14.

Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer letters*. 2007;256(1):1-24.

Robinson MB. Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *J Neurochem*. 2002;80(1):1-11.

Roda A, Chendo I, Kunz M. Biomarkers and staging of bipolar disorder: a systematic review. *Trends in psychiatry and psychotherapy*. 2015;37(1):3-11.

Rosa AR, Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Cunha AB, Quevedo J, Santin A, Gottfried C, Goncalves CA, Vieta E, Kapczinski F. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. *Neuroscience letters*. 2006;407(2):146-50.

Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(2):103-12.

Rybakowski JK. Lithium in neuropsychiatry: a 2010 update. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*. 2011;12(5):340-8.

Sabioni P, Baretta IP, Ninomiya EM, Gustafson L, Rodrigues AL, Andreatini R. The antimanic-like effect of tamoxifen: Behavioural comparison with other PKC-inhibiting and antiestrogenic drugs. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2008;32(8):1927-31.

Sacktor TC. Memory maintenance by PKMzeta--an evolutionary perspective. *Mol Brain*. 2012;5:31.

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(5):426-37.

Schilder CM, Eggens PC, Seynaeve C, Linn SC, Boogerd W, Gundy CM, Beex LV, Van Dam FS, Schagen SB. Neuropsychological functioning in postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen or exemestane after AC-chemotherapy: cross-sectional findings from the neuropsychological TEAM-side study. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 2009;48(1):76-85.

Schilder CM, Seynaeve C, Beex LV, Boogerd W, Linn SC, Gundy CM, Huizenga HM, Nortier JW, van de Velde CJ, van Dam FS, Schagen SB. Effects of tamoxifen and exemestane on cognitive functioning of postmenopausal patients with breast cancer: results from the neuropsychological side study of the tamoxifen and exemestane adjuvant

- multinational trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(8):1294-300.
- Schloesser RJ, Martinowich K, Manji HK. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends Neurosci*. 2012;35(1):36-46.
- Schou M. Pharmacology and toxicology of lithium. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1976;16:231-43.
- Schwob I, Bessiere JM, Viano J. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. *Comptes rendus biologies*. 2002;325(7):781-5.
- Sebben AD, Lichtenfels M, da Silva JL. PERIPHERAL NERVE REGENERATION: CELL THERAPY AND NEUROTROPHIC FACTORS. *Revista brasileira de ortopedia*. 2011;46(6):643-9.
- Sela B. [On the relevance of protein kinase C to lithium therapy in bipolar disorder]. *Harefuah*. 2004;143(6):414-6, 62.
- Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, Yumru M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *Journal of affective disorders*. 2008;107(1-3):89-94.
- Shelton RC, Hal Manier D, Lewis DA. Protein kinases A and C in post-mortem prefrontal cortex from persons with major depression and normal controls. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2009;12(9):1223-32.
- Shilling V, Jenkins V, Fallowfield L, Howell T. The effects of hormone therapy on cognition in breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;86(3-5):405-12.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*. 1991;91(3c):31s-8s.
- Silva BA, Dias AC, Ferreres F, Malva JO, Oliveira CR. Neuroprotective effect of *H. perforatum* extracts on beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Neurotox Res*. 2004;6(2):119-30.
- Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*. 2005;90(1-2):157-67.
- Silverstein B. Gender differences in the prevalence of somatic versus pure depression: a replication. *The American journal of psychiatry*. 2002;159(6):1051-2.
- Sims DE. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol*. 1991;7(10):431-43.

- Singh A, Naidu PS, Gupta S, Kulkarni SK. Effect of natural and synthetic antioxidants in a mouse model of chronic fatigue syndrome. *J Med Food*. 2002;5(4):211-20.
- Siwek M, Sowa-Kucma M, Dudek D, Styczen K, Szewczyk B, Kotarska K, Misztakk P, Pilc A, Wolak M, Nowak G. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(6):1558-71.
- Smid HM, Vet LE. The complexity of learning, memory and neural processes in an evolutionary ecological context. *Current opinion in insect science*. 2016;15:61-9.
- Smigan L, Perris C. Memory functions and prophylactic treatment with lithium. *Psychological medicine*. 1983;13(3):529-36.
- Soares JC, Chen G, Dippold CS, Wells KF, Frank E, Kupfer DJ, Manji HK, Mallinger AG. Concurrent measures of protein kinase C and phosphoinositides in lithium-treated bipolar patients and healthy individuals: a preliminary study. *Psychiatry Res*. 2000;95(2):109-18.
- Sohrabji F, Lewis DK. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2006;27(4):404-14.
- Sonnenwald U, Hertz L, Schousboe A. Mitochondrial heterogeneity in the brain at the cellular level. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(3):231-7.
- Steckert AV, Valvassori SS, Mina F, Lopes-Borges J, Varela RB, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Protein kinase C and oxidative stress in an animal model of mania. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9(1):47-57.
- Steckert AV, Valvassori SS, Moretti M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochemical research*. 2010;35(9):1295-301.
- Steckert AV, Valvassori SS, Varela RB, Mina F, Resende WR, Bavaresco DV, Ornell F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effects of sodium butyrate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of D-AMPH. *Neurochem Int*. 2013;62(4):425-32.
- Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological reviews*. 2008;88(4):1341-78.
- Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 2005;79(1-2):231-9.
- Sun MK, Alkon DL. Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidementic therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2010;127(1):66-77.

- Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL. Postschismic PKC activation rescues retrograde and anterograde long-term memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(34):14676-80.
- Szabo ST, Machado-Vieira R, Yuan P, Wang Y, Wei Y, Falke C, Cirelli C, Tononi G, Manji HK, Du J. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of mania. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):47-55.
- Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165(3):1207-12.
- Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem*. 1977;252(21):7603-9.
- Takebayashi M, Hisaoka K, Nishida A, Tsuchioka M, Miyoshi I, Kozuru T, Hikasa S, Okamoto Y, Shinno H, Morinobu S, Yamawaki S. Decreased levels of whole blood glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in remitted patients with mood disorders. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2006;9(5):607-12.
- Talaei A, Pourgholami M, Khatibi-Moghadam H, Faridhosseini F, Farhoudi F, Askari-Noghani A, Sadeghi R. Tamoxifen: A Protein Kinase C Inhibitor to Treat Mania: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Placebo-Controlled Trials. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2016;36(3):272-5.
- Tang P, Roldan G, Brasher PM, Fulton D, Roa W, Murtha A, Cairncross JG, Forsyth PA. A phase II study of carboplatin and chronic high-dose tamoxifen in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of neuro-oncology*. 2006;78(3):311-6.
- Tobias IS, Kaulich M, Kim PK, Simon N, Jacinto E, Dowdy SF, King CC, Newton AC. Protein kinase C ζ exhibits constitutive phosphorylation and phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate-independent regulation. *Biochem J*. 2016;473(4):509-23.
- Toker A. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci*. 1998;3:D1134-47.
- Tramontina JF, Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, Kapczinski F. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neuroscience letters*. 2009;452(2):111-3.

- Trofimiuk E, Braszko JJ. Alleviation by *Hypericum perforatum* of the stress-induced impairment of spatial working memory in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008;376(6):463-71.
- Trofimiuk E, Holownia A, Braszko JJ. Activation of CREB by St. John's wort may diminish deleterious effects of aging on spatial memory. *Archives of pharmacal research*. 2010;33(3):469-77.
- Trofimiuk E, Holownia A, Braszko JJ. St. John's wort may relieve negative effects of stress on spatial working memory by changing synaptic plasticity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2011;383(4):415-22.
- Trofimiuk E, Walesiuk A, Braszko JJ. St John's wort (*Hypericum perforatum*) diminishes cognitive impairment caused by the chronic restraint stress in rats. *Pharmacological research*. 2005;51(3):239-46.
- Trofimiuk E, Walesiuk A, Braszko JJ. St john's wort (*Hypericum perforatum*) counteracts deleterious effects of the chronic restraint stress on recall in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2006;66(2):129-38.
- Valvassori SS. Consolidação de um modelo animal de transtorno bipolar induzido pela administração intracerebroventricular de ouabaína em ratos: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2014.
- Valvassori SS, Petronilho FC, Reus GZ, Steckert AV, Oliveira VB, Boeck CR, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2008;32(4):1064-8.
- Valvassori SS, Rezin GT, Ferreira CL, Moretti M, Goncalves CL, Cardoso MR, Streck EL, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. *Journal of psychiatric research*. 2010;44(14):903-9.
- Van der Zee EA, Douma BR. Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 1997;21(3):379-406.
- van Gorp G, Meterissian GB, Haiek LN, McCusker J, Bellavance F. St John's wort or sertraline? Randomized controlled trial in primary care. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*. 2002;48:905-12.
- Vance KM, Ribnicki DM, Hermann GE, Rogers RC. St. John's Wort enhances the synaptic activity of the nucleus of the solitary tract. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2014;30(7-8 Suppl):S37-42.
- Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Amboni RT, Bianchini G, Quevedo J. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF,

- NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *Journal of psychiatric research*. 2015;61:114-21.
- Vassalle C, Novembrino C, Maffei S, Sciarrino R, De Giuseppe R, Vigna L, de Liso F, Mercuri A, Bamonti F. Determinants of oxidative stress related to gender: relevance of age and smoking habit. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(9):1509-13.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*. 2000;7(5):333-40.
- Vina J, Borras C. Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to intervene by using estrogenic compounds. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;13(3):269-78.
- Voikar V, Rossi J, Rauvala H, Airaksinen MS. Impaired behavioural flexibility and memory in mice lacking GDNF family receptor alpha2. *The European journal of neuroscience*. 2004;20(1):308-12.
- Vreeker A, van Bergen AH, Kahn RS. Cognitive enhancing agents in schizophrenia and bipolar disorder. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2015;25(7):969-1002.
- Walf AA, Koonce CJ, Frye CA. Estradiol or diarylpropionitrile administration to wild type, but not estrogen receptor beta knockout, mice enhances performance in the object recognition and object placement tasks. *Neurobiology of learning and memory*. 2008;89(4):513-21.
- Walf AA, Rhodes ME, Frye CA. Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiology of learning and memory*. 2006;86(1):35-46.
- Walker EA, Foley JJ, Clark-Vetri R, Raffa RB. Effects of repeated administration of chemotherapeutic agents tamoxifen, methotrexate, and 5-fluorouracil on the acquisition and retention of a learned response in mice. *Psychopharmacology*. 2011;217(4):539-48.
- Wallenstein GV, Vago DR, Walberer AM. Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. *Behav Brain Res*. 2002;133(2):159-64.
- Walz JC, Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Cacilhas AA, Valvassori SS, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania. *Journal of psychiatric research*. 2008;42(5):416-21.

Wang HY, Friedman E. Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorder brains. *Biol Psychiatry*. 1996;40(7):568-75.

Wang HY, Markowitz P, Levinson D, Undie AS, Friedman E. Increased membrane-associated protein kinase C activity and translocation in blood platelets from bipolar affective disorder patients. *Journal of psychiatric research*. 1999;33(2):171-9.

Weeber EJ, Atkins CM, Selcher JC, Varga AW, Mirnikjoo B, Paylor R, Leitges M, Sweatt JD. A role for the beta isoform of protein kinase C in fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(16):5906-14.

Wegener G, Bandpey Z, Heiberg IL, Mork A, Rosenberg R. Increased extracellular serotonin level in rat hippocampus induced by chronic citalopram is augmented by subchronic lithium: neurochemical and behavioural studies in the rat. *Psychopharmacology*. 2003;166(2):188-94.

Wehner JM, Sleight S, Upchurch M. Hippocampal protein kinase C activity is reduced in poor spatial learners. *Brain research*. 1990;523(2):181-7.

Wharton W, Gleason CE, Olson SR, Carlsson CM, Asthana S. Neurobiological Underpinnings of the Estrogen - Mood Relationship. *Current psychiatry reviews*. 2012;8(3):247-56.

Widy-Tyszkiewicz E, Piechal A, Joniec I, Blecharz-Klin K. Long term administration of Hypericum perforatum improves spatial learning and memory in the water maze. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2002;25(10):1289-94.

Wiener C, Rassier GT, Kaster MP, Jansen K, Pinheiro RT, Klamt F, Magalhaes PV, Kapczinski F, Ghisleni G, da Silva RA. Gender-based differences in oxidative stress parameters do not underlie the differences in mood disorders susceptibility between sexes. *Eur Psychiatry*. 2014;29(1):58-63.

Wilkinson SE, Hallam TJ. Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? *Trends in pharmacological sciences*. 1994;15(2):53-7.

Williams RS, Cheng L, Mudge AW, Harwood AJ. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*. 2002;417(6886):292-5.

Willson TM, Henke BR, Momtahan TM, Charifson PS, Batchelor KW, Lubahn DB, Moore LB, Oliver BB, Sauls HR, Triantafillou JA, et al. 3-[4-(1,2-Diphenylbut-1-enyl)phenyl]acrylic acid: a non-steroidal estrogen with functional selectivity for bone over uterus in rats. *Journal of medicinal chemistry*. 1994;37(11):1550-2.

- Wilson CA, Davies DC. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* (Cambridge, England). 2007;133(2):331-59.
- Wolfe U, Seelinger G, Schempp CM. Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med*. 2014;80(2-3):109-20.
- Wood SJ, Berger GE, Wellard RM, Proffitt TM, McConchie M, Berk M, McGorry PD, Pantelis C. Medial temporal lobe glutathione concentration in first episode psychosis: a 1H-MRS investigation. *Neurobiology of disease*. 2009;33(3):354-7.
- Wu-Zhang AX, Newton AC. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. *Biochem J*. 2013;452(2):195-209.
- Xu P, Rosen KM, Hedstrom K, Rey O, Guha S, Hart C, Corfas G. Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia*. 2013;61(7):1029-40.
- Yang HW, Hu XD, Zhang HM, Xin WJ, Li MT, Zhang T, Zhou LJ, Liu XG. Roles of CaMKII, PKA, and PKC in the induction and maintenance of LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Journal of neurophysiology*. 2004;91(3):1122-33.
- Yasuda S, Liang MH, Marinova Z, Yahyavi A, Chuang DM. The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Molecular psychiatry*. 2009;14(1):51-9.
- Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, O'Donovan C, Macqueen G, McIntyre RS, Sharma V, Ravindran A, Young LT, Milev R, Bond DJ, Frey BN, Goldstein BI, Lafer B, Birmaher B, Ha K, Nolen WA, Berk M. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar disorders*. 2013;15(1):1-44.
- Yildiz A, Aydin B, Gokmen N, Yurt A, Cohen B, Keskinoglu P, Ongur D, Renshaw P. Antimanic Treatment With Tamoxifen Affects Brain Chemistry: A Double-Blind, Placebo-Controlled Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2016;1(2):125-31.
- Yildiz A, Guleryuz S, Ankerst DP, Ongur D, Renshaw PF. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania: a double-blind, placebo-controlled trial of tamoxifen. *Archives of general psychiatry*. 2008;65(3):255-63.

- Yildiz A, Vieta E, Leucht S, Baldessarini RJ. Efficacy of antimanic treatments: meta-analysis of randomized, controlled trials. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(2):375-89.
- Young LT, Li PP, Kish SJ, Siu KP, Warsh JJ. Postmortem cerebral cortex Gs alpha-subunit levels are elevated in bipolar affective disorder. *Brain research*. 1991;553(2):323-6.
- Young MA, Scheftner WA, Fawcett J, Klerman GL. Gender differences in the clinical features of unipolar major depressive disorder. *The Journal of nervous and mental disease*. 1990;178(3):200-3.
- Yumru M, Savas HA, Kalenderoglu A, Bulut M, Celik H, Erel O. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2009;33(6):1070-4.
- Zarate CA, Jr., Singh J, Manji HK. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biological psychiatry*. 2006;59(11):1006-20.
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Quiroz J, Jolkovsky L, Luckenbaugh DA, Manji HK. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar disorders*. 2007;9(6):561-70.
- Zarate CA, Manji HK. Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS drugs*. 2009;23(7):569-82.
- Zhang X, Zhang Z, Sha W, Xie C, Xi G, Zhou H, Zhang Y. Effect of treatment on serum glial cell line-derived neurotrophic factor in bipolar patients. *Journal of affective disorders*. 2010;126(1-2):326-9.
- Zhang Y, Zong W, Zhang L, Ma Y, Wang J. Protein kinase M zeta and the maintenance of long-term memory. *Neurochem Int*. 2016;99:215-20.
- Zhao WQ, Sedman GL, Gibbs ME, Ng KT. Effect of PKC inhibitors and activators on memory. *Behav Brain Res*. 1994;60(2):151-60.
- Zheleva-Dimitrova D, Nedialkov P, Kitanov G. Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. *Pharmacogn Mag*. 2010;6(22):74-8.
- Zhou W, Wang N, Yang C, Li XM, Zhou ZQ, Yang JJ. Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Eur Psychiatry*. 2014;29(7):419-23.
- Zhou Z, Wang Y, Tan H, Bharti V, Che Y, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizer lithium inhibits amphetamine-induced risk-taking manic-like behaviors. *Neuroscience letters*. 2015;603:84-8.

Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J Agric Food Chem*. 2004;52(16):5032-9.

Zou YP, Lu YH, Wei DZ. Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytotherapy research : PTR*. 2010;24 Suppl 1:S6-s10.

Anexo A – Parecer da Comissão de ética no Uso de Animais



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 007/2013

Professor Responsável: João Quevedo

Equipe: Emilio Luiz Streck, Gabriela Kozuchovski Ferreira, Roger Varela, Daniela V. Bavaresco, Samira Valvassori, Juliane F. Carvalho, Leticia F. Calegari, Gustavo C. Dal Pont, Camila O. Arent, Wilson R. Resende, Josiane Budni.

Título: "Investigação pré-clínica do potencial terapêuticode inibidores de Proteína Quinase C em modelos de transtornos do humor."

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 594 Ratos Wistar 60 300g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 007/2013

Principal Investigator: João Quevedo

Researchers: Emilio Luiz Streck, Gabriela Kozuchovski Ferreira, Roger Varela, Daniela V. Bavaresco, Samira Valvassori, Juliane F. Carvalho, Leticia F. Calegari, Gustavo C. Dal Pont, Camila O. Arent, Wilson R. Resende, Josiane Budni.

Project title: "Preclinical investigation of the therapeutic potential ofinhibiting Protein Kinase C in models of mood disorders.".

The project was **Approved** is its ethical and methodological aspects. Any alteration of the oriinal version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact uso n www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 19 de fevereiro de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA

Anexo B – Adendo – Protocolo: AD-007/2013
Parecer da Comissão de ética no Uso de Animais



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: ADENDO 007/2013

Professor Responsável: João Quevedo

Equipe: Emilio Luiz Streck, Gabriela Kozuchovski Ferreira, Roger Varela, Daniela V. Bavaresco, Samira Valvassori, Juliane F. Carvalho, Letícia F. Calegari, Gustavo C. Dal Pont, Camila O. Arent, Wilson R. Resende, Josiane Budni, Cenita Pereira Borges.

Título: “Investigação pré-clínica do potencial terapêutico de inibidores de Proteína Quinase C em modelos de transtornos do humor.”

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 594 Ratos Wistar 60 dias/300g (342 machos; 252 fêmeas). Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: ADENDO 007/2013

Principal Investigator: João Quevedo

Researchers: Emilio Luiz Streck, Gabriela Kozuchovski Ferreira, Roger Varela, Daniela V. Bavaresco, Samira Valvassori, Juliane F. Carvalho, Letícia F. Calegari, Gustavo C. Dal Pont, Camila O. Arent, Wilson R. Resende, Josiane Budni, Cenita Pereira Borges.

Project title: “Preclinical investigation of the therapeutic potential of inhibiting Protein Kinase C in models of mood disorders.”

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesp.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesp.net.

Griciúma, 02 de dezembro de 2014.

Patricia Fernanda Schuck
Coordenadora da CEUA

